



Etude de nouveaux marqueurs moléculaires pour le diagnostic précoce et le pronostic des cancers

Gang Feng

► To cite this version:

Gang Feng. Etude de nouveaux marqueurs moléculaires pour le diagnostic précoce et le pronostic des cancers. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2010. Français. NNT : 2010STET003T . tel-00672376

HAL Id: tel-00672376

<https://theses.hal.science/tel-00672376>

Submitted on 21 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JEAN-MONNET DE SAINT-ETIENNE

Thèse de doctorat en
BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Présentée par

Monsieur Gang Feng

**ETUDE DE NOUVEAUX MARQUEURS MOLECULAIRES POUR LE
DIAGNOSTIC PRECOCE ET LE PRONOSTIC DES CANCERS RENAU**

Soutenue publiquement le 19 Mai 2010 devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Marc COLOMBEL	Rapporteur
Monsieur le Docteur Alain DOUCET	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean-Paul BOITEUX	Examineur
Monsieur le Docteur Guorong LI	Examineur
Monsieur le Professeur Jacques TOSTAIN	Co-directeur de Thèse
Monsieur le Professeur Christian GENIN	Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Christian GENIN pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir encadré ce travail.

Je remercie également le Professeur Jacques TOSTAIN et le Professeur Guorong LI pour leurs conseils et leur appui dans la rédaction de cette thèse.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, le Professeur Marc COLOMBEL et le Professeur Alain DOUCET pour avoir accepté la charge de rapporteur, le Professeur Jean-Paul BOITEUX pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Docteur Anne GENTIL-PERRET pour m'avoir fourni les résultats des examens anatomo-pathologiques des tumeurs.

Je remercie les techniciennes et techniciens, notamment David LAURENT pour son aide et sa gentillesse.

Je remercie également le Comité de la Loire de la Ligue Nationale Contre le Cancer pour son soutien financier.

Enfin, je remercie mes parents, ma femme et mes amis qui m'ont toujours encouragé et soutenu moralement.

Abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BET: Bromure d'éthidium

CA: Anhydrase Carbonique

CCR : Carcinome à cellules rénales

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CRCC : Carcinome rénal à cellules conventionnelles (cellules claires)

CRCH : Carcinome rénal chromophile

CRTP : Carcinome rénal tubulo-papillaire

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FCM: Cytométrie de flux

FNA : Fine Needle Aspiration (Aspiration à l'aiguille fine)

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HIF: Hypoxia Inducible Factor

PCR: Polymerase Chain Reaction

pVHL : Von Hippel Lindau protein

RT: Transcription inverse

TNM: Tumeur primitive (T), ganglions lymphatiques régionaux (N), Métastases à distance (M)

UIV : Urographie intraveineuse

VHL : Von Hippel-Lindau

Figures

Figure 1. Mécanismes impliqués dans l'accumulation d'HIF.

Figure 2. Localisation cellulaire de la famille α de l'anhydrase carbonique.

Figure 3. Fonction-physiologie des CA9 et CA12.

Figure 4. Expression tissulaire des CA dans le tissu rénal sain et dans les CCR.

Figure 5. Technique PCR avec SYBR Green[®].

Figure 6. Tailles des différentes bandes d'ADN standard sur gel d'agarose.

Figure 7. Localisation des amorces du gène GAPDH.

Figure 8. Courbes de fluorescence de PicoGreen[®] avec l'ARN (RNA), l'ADN double brin (ds DNA) et l'ADN simple brin (ss DNA).

Figure 9. Technique ELISA en sandwich.

Figure 10. Courbe standard des densités optiques en ELISA pour CA9.

Figure 11. Taux de CA9 ARNm dans le sérum avant (J0) et après (J7) exérèse d'un CRCC.

Figure 12. Courbe ROC évaluant la valeur diagnostique du taux d'ARNm de CA9 dans le sérum des tumeurs du rein.

Figure 13. Courbe ROC évaluant la valeur diagnostique de l'ADN circulant dans les CRCCs.

Tableaux

Tableau I. Expression de l'ARNm chez des sujets atteints de CRCC, de CRTP, de CRCH, d'oncocytome rénal, de kyste du rein et chez des sujets témoins sains.

Tableau II. Séquences des amorces de GAPDH.

Tableau III. Taux d'ARNm de CA9 dans le sérum de sujets atteints de CRCC et de sujets témoins sains.

Tableau IV. Niveaux de l'ADN circulant dans le sérum chez des sujets atteints de CRCC, de CRTP, de CRCH, d'oncocytome rénal, de kyste du rein et chez des sujets témoins sains.

Tableau V. Taux de l'ADN circulant dans le sérum de sujets atteints de différents types de CCR et de sujets témoins sains.

SOMMAIRE

Abréviations	2
Figures	4
Tableaux	5
SOMMAIRE	6
Résumé	11
Summary	12
Introduction	13
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	15
1. Le cancer du rein	16
1.1 Diagnostic	16
1.1.1 Diagnostic radiologique	16
1.1.2 Diagnostic histologique	17
1.1.2.2 Tumeurs bénignes	18
1.1 Pronostic	19
1.2.1 Type histologique	19
1.2.2 Grade nucléaire	19
1.2.3 Stade	20

1.2.4 Ploïdie et prolifération cellulaire	20
1.2.5 Marqueurs de l'adhésion cellulaire.....	20
2. Les marqueurs moléculaires du carcinome rénal.....	21
2.1 La voie HIF dans le cancer du rein	21
2.1.1 Le gène VHL	23
2.1.2 CA: L'anhydrase carbonique.....	24
2.1.2.1 Historique	24
2.1.2.2 Fonction-physiologie des CAs	25
2.1.2.3 Détection de CA9 dans les cellules et les tissus	26
3. Autres marqueurs moléculaires du CCR.....	29
4. Recherche de marqueurs moléculaires sériques	30
4.1 ARN circulant.....	30
4.2 ADN circulant.....	31
4.2.1 Source de l'ADN circulant	31
4.2.2 Quantification de l'ADN circulant.....	32
4.2.3 Intégrité de l'ADN circulant.....	33
5. Les objectifs du travail.....	34

PARTIE EXPERIMENTALE	35
I - Matériels et Méthodes	36
1. Matériels	37
1.1 Patients et témoins sains	37
1.2 Collecte des échantillons	37
2. Méthodes	37
2.1 Extraction de l'ARN	37
2.2 Extraction de l'ADN	38
2.3 Transcription inverse (RT)	38
2.4 RT-PCR one-step	39
2.5 PCR traditionnelle	39
2.6 PCR quantitative	40
2.7 Electrophorèse	41
2.8 Mesure de l'intégrité de l'ADN circulant	42
2.9 PicoGreen [®] assay	43
2.10 Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay (ELISA)	44
II- Résultats	46
1. Premier article	47

1.1	Introduction	48
1.2	Discussion	55
2.1	Introduction	57
2.2	Discussion	62
3.	Troisième article.....	63
3.1	Introduction	64
3.2	Discussion.....	70
4.	Article 1 en cours	71
4.1	Introduction de l'article	71
4.2	Matériels et méthodes.....	72
4.3	Résultats préliminaires	74
4.4	Discussion des résultats.....	77
5.	Article 2 en cours	79
5.1	Introduction de l'article	79
5.2	Matériels et méthodes.....	80
5.3	Résultats préliminaires.....	81
5.4	Discussion.....	84
III-	Discussion générale	86

IV - Conclusion générale	94
V- BIBLIOGRAPHIE	96

Résumé

Le but de notre étude est d'évaluer si les marqueurs moléculaires peuvent détecter de façon sensible des carcinomes du rein (CCR) et aider à un diagnostic précoce et au suivi des patients.

Dans ce travail, nous avons utilisé les méthodes courantes telles que la spectrométrie, la PCR, l'ELISA et le PicoGreen® pour évaluer l'ADN circulant, l'intégrité de l'ADN circulant, l'ARN circulant, l'ARNm de CA9, et la protéine CA9.

Le niveau de l'ARN circulant et celui de l'ARNm de CA9 chez les patients atteints de carcinomes rénaux à cellules claires (CRCC) sont plus élevés que chez les témoins sains. Chez les patients atteints de CRCC, le niveau de l'ARN circulant est indépendant de l'âge, du sexe, du stade TNM, du grade Fuhrman, et de la taille de la tumeur. Le niveau de l'ARNm de CA9 est indépendant de l'âge, du sexe et du grade Fuhrman, mais est corrélé au stade TNM, à la présence de métastases et à la taille de la tumeur. Selon nos résultats, l'ARN circulant et l'ARNm de CA9 dans le sérum peuvent être utilisés comme biomarqueurs diagnostiques du CRCC.

Par spectrométrie et par la méthode de PicoGreen®, la moyenne de l'ADN circulant chez les patients atteints de CRCC est plus élevée que chez les témoins sains, mais cette différence n'est pas significative. Nos résultats indiquent que la sensibilité et la spécificité de l'ADN circulant ne sont pas satisfaisantes pour le diagnostic de CRCC. En outre, l'intégrité de l'ADN circulant chez les patients atteints de CRCC est meilleure que chez les patients atteints d'oncocytome rénal et que chez les témoins sains. L'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum pourrait constituer un marqueur pour le diagnostic de CRCC.

Le niveau de protéine CA9 chez les patients atteints de CRCC métastatique est plus élevé que chez les patients atteints de CRCC localisé et que chez les témoins sains. Le niveau élevé de protéine CA9 suggère un risque élevé de récurrence. La protéine CA9 dans le sérum pourrait être utilisée pour guider le suivi post opératoire et peut être dans l'avenir conduire à un traitement adjuvant précoce des patients du groupe à haut risque de récurrence.

Mots-clés : marqueur moléculaire, diagnostic, pronostic, cancer rénal

Summary

The aim of our study is to estimate whether molecular markers could detect significantly and help early diagnosis and following of patients with CRC.

In this work, we used some methods such as spectrometry, PCR, ELISA and PicoGreen® to evaluate the circulating DNA, the integrity of circulating DNA, the circulating RNA, the mRNA CA9 of serum and the circulating CA9 protein in the diagnosis or monitoring of CRC.

The level of RNA and the mRNA CA9 of serum in patients with CRCC are higher than in healthy controls. In patients with CRCC, the level of circulating RNA is independent of age, gender, TNM stage, Fuhrman grade, and tumor size. The level of mRNA CA9 is independent of age, sexe and Fuhrman grade, but is correlated with TNM stage, presence of metastases and tumor size. According to our results, the circulating RNA and mRNA CA9 of serum can be used as diagnostic biomarkers of CRCC.

By the spectrometry and the PicoGreen ® method, the average serum DNA in patients with CRCC is higher than in healthy controls, but this difference is not significant. Our results indicate that the sensitivity and specificity of serum DNA is not satisfactory for the diagnosis of CRCC. In addition, the integrity of serum DNA in patients with CRCC is better than in patients with renal oncocytoma and also better than in healthy controls. The integrity of DNA in the serum could be a marker for the diagnosis of CRCC.

The level of CA9 protein in patients with metastatic CRCC is higher than in patients with CRCC localized and also higher than in healthy controls. The high level of CA9 protein suggests a high risk of recurrence. The serum CA9 protein could be used to guide post-operative monitoring and may be indicating early adjuvant treatment of patients with high risk of recurrence in the future.

Introduction

Le cancer du rein de l'adulte est fréquent et le diagnostic préopératoire fait principalement appel à l'imagerie. L'attitude thérapeutique évolue de façon spectaculaire et les standards thérapeutiques sont en train de changer. Le traitement de référence d'une tumeur du rein supposée maligne était la néphrectomie élargie. Si cette attitude reste indiscutable pour les tumeurs de grande taille manifestement malignes, elle l'est beaucoup moins pour les tumeurs de petite taille (≤ 4 cm) dont la découverte est très fréquente grâce à la multiplication des bilans radiologiques et aux progrès de l'imagerie. Dans les tumeurs malignes de petite taille, la chirurgie d'exérèse partielle a définitivement fait la preuve de son efficacité carcinologique et de son utilité en préservant le parenchyme rénal et constitue le nouveau standard figurant dans les recommandations de l'Association Française d'Urologie. Lorsque ces tumeurs de petite taille s'avèrent bénignes à l'analyse anatomo-pathologique, la chirurgie partielle a, là aussi, limité le sacrifice parenchymateux ; néanmoins, ces geste restent inutiles dans ce contexte.

La nécessité d'un diagnostic précis de la nature d'une petite tumeur rénale est rendue encore plus évidente au regard du développement récent des techniques de destruction tumorale transcutanée. Ces techniques mettent en œuvre différentes sources d'énergie dont les radio-fréquences sont les plus utilisées actuellement. Ces techniques sont très prometteuses en raison de leur caractère mini-invasif. Si leur efficacité se confirme, elles seront destinées en priorité au traitement des petites tumeurs dont la nature devra être connue avec certitude.

Le diagnostic des tumeurs de petite taille reste difficile et nécessite fréquemment le recours à l'examen cytologique ou histologique d'un prélèvement percutané. La spécificité des différentes méthodes est très élevée, mais la sensibilité est limitée. La ponction à l'aiguille fine est une méthode simple et sûre avec une sensibilité qui dépasse à peine 50 % dans le cadre de ces diagnostics difficiles, essentiellement du fait de la pauvreté du recueil cellulaire. La sensibilité de la biopsie percutanée

est meilleure mais s'avère plus complexe à mettre en œuvre et comporte une morbidité potentielle plus élevée. Ce défaut de sensibilité des deux techniques est générateur d'examens d'imagerie supplémentaires et de retard au traitement ou à l'inverse, dans certains cas de tumeurs bénignes, d'interventions injustifiées. Ces performances limitées justifient pleinement la recherche active de marqueurs moléculaires fiables. Nous pensons que l'analyse en biologie moléculaire, par sa sensibilité, sa spécificité et sa capacité à traiter des prélèvements pauvres en cellules, peut apporter une aide précieuse au diagnostic cytologique et orienter le traitement vers l'option la mieux adaptée à la nature de la lésion et à l'état du patient. Les petites tumeurs malignes pourront alors être traitées soit par chirurgie partielle ouverte ou coelioscopique, soit par destruction transcutanée. Des traitements inutiles et coûteux seront évités aux patients porteurs d'une tumeur bénigne.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Le cancer du rein

Le cancer rénal représente 3% des cancers de l'adulte [Ferlay, J. et al. 2007] et est la 7^e tumeur maligne chez l'homme et la 12^e chez la femme. En France, 7 949 nouveaux cas ont ainsi été recensés en 2005 selon l'Institut de veille sanitaire, tandis que la maladie emportait 3 684 personnes. Il est 2 fois plus fréquent chez l'homme. Avec 3600 décès/an (2,4%), il n'est qu'au 13^e rang des décès par cancer [Coulange C et al. 2004]. Le terme de cancer du rein recouvre plusieurs types histologiques, mais la variété la plus fréquente (80% des cancers du rein) est le carcinome rénal à cellules conventionnelles ou carcinome à cellules claires [Jemal A et al. 2005].

Bien que les symptômes fonctionnels ou généraux classiques restent possibles, le diagnostic est maintenant principalement fait sur les examens radiologiques (échographie et tomodensitométrie abdominale). 30% à 75% des cancers du rein sont découverts fortuitement [Siow WY et al. 2000].

1.1 Diagnostic

1.1.1 Diagnostic radiologique

L'échographie et le scanner ont totalement remplacé les anciennes méthodes (UIV, artériographie). Ces examens d'imagerie moderne assurent habituellement le diagnostic et contribuent au bilan d'extension.

- Echographie abdominale : elle montre typiquement une tumeur solide déformant les contours du rein, isoéchogène. Les tumeurs volumineuses peuvent être hétérogènes avec des plages hypoéchogènes correspondant aux zones de nécrose.
- Scanner abdominal : il est réalisé après injection d'un produit de contraste iodé. Il peut être couplé avec un cliché d'UIV post-injection (surtout en cas de doute diagnostique avec une tumeur de la voie excrétrice). Il montre une masse déformant

les contours du rein, de densité tissulaire (30 à 50 UH), se rehaussant après injection (de plus de 20 UH), sans composante grasseuse, souvent hétérogène pour les tumeurs de gros volume avec des zones de nécrose hypodenses.

1.1.2 Diagnostic histologique

Le cancer du rein provient des différents segments des canaux urinaires intraparenchymateux (tubules proximaux, distaux, collecteurs). Pour un même site d'origine, les morbidités peuvent être très différentes. Selon les caractéristiques morphologiques définies par l'OMS, la Classification Histologique internationale des tumeurs du rein permet de distinguer : [Eble JN et al. 2004, Storkel S et al. 1997].

1.1.2.1 Tumeurs malignes

Les carcinomes à cellules rénales (CCR)

- Carcinome rénal à cellules conventionnelles ou cellules claires (CRCC) :

Il représente 60 % à 80 % des cancers du rein. L'origine des cellules tumorales est l'épithélium du tube contourné proximal. Il s'associe à une délétion du bras court du chromosome 3p25-26 (la maladie de VHL) et même dans les formes sporadiques les altérations génétiques concernent le plus souvent le chromosome 3p.

- Carcinome tubulo-papillaire (CRTP) :

Il s'agit de tumeurs développées à partir du tube contourné distal représentant 10 à 15 % des cancers du rein. Les altérations génétiques les plus fréquemment observées dans ce groupe de tumeurs sont la perte du chromosome Y et une trisomie des chromosomes 7 et 17. Il est composé de 2 types : type I (75 %) volontiers multifocal et de bas grade constitué de petites cellules basophiles et type II unifocal et de haut grade constitué de grandes cellules éosinophiles.

- Carcinome à cellules rénales chromophobes (CRCH) :

Ils représentent 4 à 7 % des cancers du rein. Ils sont caractérisés par une perte des chromosomes 1, 2 ou 13 et une perte du bras court du chromosome 3 dans 50 % des cas. Ils sont développés à partir des cellules intercalaires de type B du tube collecteur.

- Carcinome des tubes collecteurs (Bellini) et carcinome médullaire du rein (CCRTC) :

Il s'agit de tumeurs de très mauvais pronostic représentant moins de 1 % des cancers du rein et touchant l'homme jeune. D'un point de vue génétique, les monosomies 18 et 21 et la perte du chromosome Y sont les anomalies prédominantes ; des délétions au niveau du bras long du chromosome 1 et du bras court du chromosome 8 ont été décrites. Il doit rester un diagnostic d'exclusion.

- Carcinome à cellules rénales inclassables :

5 % des CCR que la seule analyse morphologique ne peut typer.

1.1.2.2 Tumeurs bénignes

- Adénome papillaire :

Essentiellement retrouvé dans les reins de néphro-angiosclérose, multifocal et souvent asymptomatique, il coexiste avec d'authentiques carcinomes tubulo-papillaires ; ainsi, par définition, les lésions de moins de 5 mm sont appelées adénomes papillaires.

- Adénome métanéphrique :

Touche plus souvent les femmes et réalise une lésion corticale de consistance homogène.

- Oncocytome :

Les oncocytomes représentent 5 % de l'ensemble des tumeurs du rein. Ces tumeurs sont souvent diploïdes sans anomalie sur le chromosome 3 mais avec des anomalies spécifiques d'ADN mitochondrial. Ces tumeurs se développent à partir des cellules intercalaires de type A du tube collecteur. Leurs caractéristiques sont parfois la bilatéralité, la présence de lésions multi-focales et un aspect solide peu spécifique en échographie et au scanner. Par contre, lorsqu'ils sont de petite taille, le diagnostic avec le cancer du rein est impossible à faire car ils ont le même aspect en imagerie. Le pronostic est bon et l'abstention thérapeutique est de mise dans les tumeurs de petite taille lorsque le diagnostic a pu être fait avec certitude.

1.1 Pronostic

1.2.1 Type histologique

L'intérêt de la classification histologique des tumeurs est leur signification clinique en termes de survie. Du meilleur au plus mauvais pronostic, on trouve les carcinomes à cellules chromophobes, les carcinomes tubulo-papillaires et les carcinomes rénaux.

1.2.2 Grade nucléaire

Plusieurs systèmes ont été proposés, mais celui de Furhman [Fuhrman SA et al. 1982] est actuellement le plus utilisé. Il s'agit d'un grade nucléaire en 4 classes selon la taille du noyau et du nucléole des cellules carcinomateuses. Sa valeur pronostique est bien validée pour les carcinomes rénaux et les tubulo-papillaires.

1.2.3 Stade

Le stade tumoral décrit la taille de la tumeur et l'éventuelle extension au-delà du rein. Le stade tumoral et la taille sont reconnus comme des facteurs pronostiques importants. La dernière classification TNM date de 2002 et est notamment utilisée pour le pronostic [Cohen HT et al. 2005]. La survie à 5 ans varie de 80% pour les tumeurs de stade I à 50% pour les stades II, 40% pour les stades III et 10% pour les stades IV. Les tumeurs de plus de 10 cm ont un pronostic plus péjoratif, bien que des métastases ganglionnaires aient été rapportées pour des tumeurs de moins de 6 cm et même de 3 cm.

1.2.4 Ploïdie et prolifération cellulaire

Plusieurs études ont évalué la ploïdie en cytométrie en flux dans les cancers du rein. La ploïdie est corrélée au grade de la tumeur mais pas à la survie des patients atteints de cancer localisé. Ces résultats sont expliqués par l'hétérogénéité des tumeurs rénales. Les marqueurs de prolifération cellulaire (Ki-67, AgNOR ou Mib-1) apparaissent dans des études rétrospectives corrélées au grade nucléaire et à la survie des patients [WT de Riese et al. 1993]. Pour certains auteurs, le marqueur de la prolifération Mib-1 serait un facteur pronostique supérieur au grade tumoral [Tannapfel A et al. 1998].

1.2.5 Marqueurs de l'adhésion cellulaire

Les molécules d'adhésion cellulaire (cadhérines, caténines et intégrines) sont nécessaires à l'adhésion intercellulaire et aux ponts intercellulaires [Katagiri A et al. 1995]. Elles sont aussi considérées comme des oncoprotéines dans certaines tumeurs et joueraient un rôle dans la cancérogenèse. Dans quelques études,

l'augmentation de l'expression de CD44 ou une diminution de l'expression de certaines caténines sont associées à un mauvais pronostic [Paradis V et al. 1999].

Un quart des patients est diagnostiqué avec une maladie d'emblée avancée, localement invasive ou métastatique. La survie à 5 ans des formes localisées varie de 50% à 95%. Par contre, la survie à 5 ans des formes métastatiques est de 5% environ, avec une médiane de survie de 13 mois environ. Un tiers des patients traités pour une maladie localisée présenteront une récurrence [Leslie H et al. 2002].

Le diagnostic précoce et la détermination de facteurs pronostiques fiables s'avèrent donc particulièrement importants dans le cancer du rein.

Le pronostic du cancer rénal dépend du stade TNM, du grade de Fuhrman, de l'état général du patient (ECOG) et de l'invasion vasculaire macro ou microscopique. Si la classification TNM et le grade Fuhrman permettent une stratification pronostique grossière, ils ne permettent cependant pas de prédire le risque évolutif (récurrence locale ou apparition de métastases) à l'échelon individuel [Bassil B et al. 1985, Margulis V et al. 2007].

La recherche de nouveaux marqueurs moléculaires autorisant un diagnostic précoce et un pronostic plus fin est donc une nécessité impérieuse, dans le cancer du rein comme dans tous les types de cancer.

2. Les marqueurs moléculaires du carcinome rénal

2.1 La voie HIF dans le cancer du rein

Le HIF (Hypoxia Inducible Factor) est très instable en normoxie, la sous-unité alpha subit une hydroxylation, par des prolyl-hydroxylases (PHD), dès sa sortie du noyau,

puis se lie à la pVHL (von Hippel Lindau protein), une protéine suppressive de tumeur, élongine B, élongine C, culline et Ring box 1 [Semenza GL. 2000]. En normoxie. Le complexe VHL a une activité E3 ligase permettant l'ubiquitination de HIF-1 α et sa dégradation par le protéasome cytoplasmique [Ivan M et al. 2001]. Cette étape se produit assez rapidement, puisque HIF- α possède une demie-vie de seulement 5 minutes dans le cytoplasme [Wang GL et al. 1993]. De plus, la normoxie cellulaire entraîne aussi l'activation de la protéine factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) qui agit au niveau du noyau en bloquant la transcription de gènes cibles comme l'EPO. De son côté, la sous-unité bêta est toujours active, sous l'influence du facteur de transcription sp1 [Schofield CJ et al. 2004].

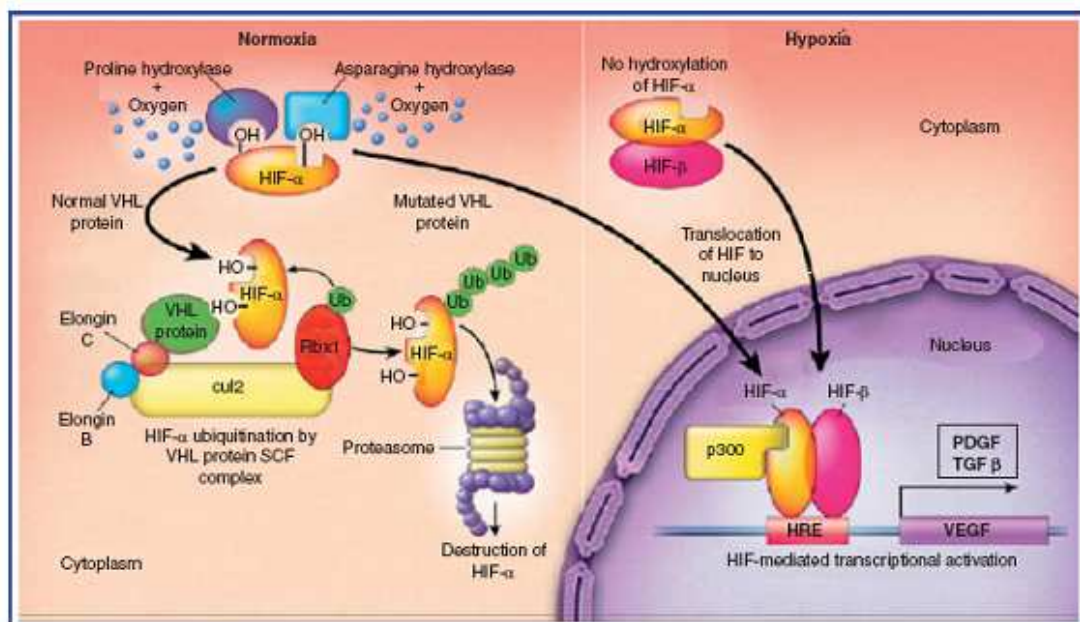


Figure 1. Mécanismes impliqués dans l'accumulation d'HIF. (Mejean A., Lebret T. : Angiogenèse : l'exemple du cancer rénal. Prog Urol, 2008, S7, 309-314)

En situation d'hypoxie, HIF- α devient stable, car elle n'est plus hydroxylée par les PHD (son substrat étant l'oxygène), donc elle ne lie plus la protéine pVHL. Elle est alors transportée dans le noyau par translocation nucléaire où elle se liera à la sous-unité bêta ainsi qu'à certains co-facteurs comme le p300/CBP. Le complexe HIF (réunion de HIF- α et HIF- β) subit alors une translocation à l'intérieur du noyau et se

lie au HRE (HIF responsive element) induisant une séquence de transcription de gènes induite par l'hypoxie [Wiesener MS et al. 2001, Wykoff CC et al. 2000] :

- VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*) → angiogenèse ;
- EGFR(*Epithelial Growth Factor Receptor*) type1→ croissance cellulaire tumorale ;
- PDGFβ (*platelet-derived growth factor*) ;
- glut1 (transporteur de glucose) ;
- TGFα ;
- CA9 ;
- érythropoïétine.

Parallèlement HIF-α diminue l'expression d'E-cadhérine favorisant ainsi les disjonctions cellulaires et la diffusion métastatique.

En résumé l'accumulation d'HIF-α secondaire à l'hypoxie et/ou à la perte du gène VHL, va conduire à une accumulation d'effecteurs provoquant l'angiogenèse, l'augmentation de la croissance cellulaire et de la survie en condition d'hypoxie.

2.1.1 Le gène VHL

Le gène VHL est un gène suppresseur de tumeur localisé sur le bras court du chromosome 3 (3p26-p25) [Latif F, et al. 1993]. Des mutations du gène VHL ou une hyperméthylation ont été décrites dans 57% des CRCC et 11% des CRTP. En outre, la perte d'hétérozygotie du locus du gène VHL au chromosome 3p25 a été détectée dans plus de 90% des CRCC. Ces altérations du gène VHL sont absentes dans le CRCH et l'oncocytome rénal [Gnarra JR et al. 1994, Brauch H et al. 2000]. Ces altérations génétiques ne varient pas selon la progression tumorale, la taille de la

tumeur, le stade, le grade, les métastases distantes et les métastases ganglionnaires [Kondo K et al. 2002].

L'altération du gène VHL est un facteur pronostique indépendant chez les patients avec des tumeurs de stade I-III, comme le sexe, l'âge, le stade, le grade, et la présentation symptomatique. Mais, les altérations de VHL ne sont pas associées à la survie du cancer chez les 53 patients avec des tumeurs de stade IV après néphrectomie élargie ou partielle [Yao M et al. 2002].

2.1.2 CA: L'anhydrase carbonique

2.1.2.1 Historique

L'anhydrase carbonique a été purifiée à partir de globules rouges en 1933 [Meldrum NU et al. 1933]. Jusqu'en 1994, cinq anhydrases carboniques ont été purifiées à partir de procaryotes [Smith KS et al. 1999].

Il y a trois familles distinctives d'anhydrase carbonique (α , β et γ). Seule la famille α d'anhydrase carbonique se trouve dans les cellules de mammifères. La localisation cellulaire de la famille α de l'anhydrase carbonique se situe dans le cytosol (CA1, CA2, CA3, CA7, CA13), sur la membrane (CA4, CA9, CA12, CA14, CA15, CA16), dans les mitochondries (CA5) et elle peut être sécrétée (CA6).

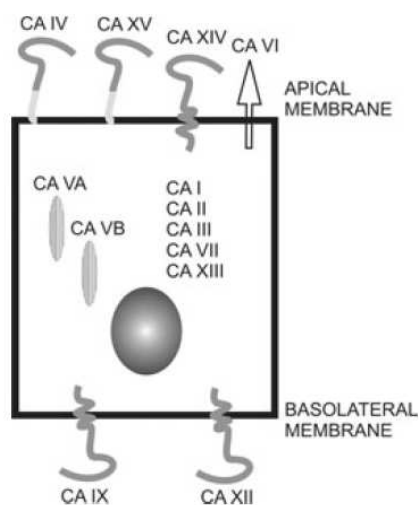


Figure 2. Localisation cellulaire de la famille α de l'anhydrase carbonique. (Parkkila S, BJU Int. 2008, 101, S4, 16-21)

2.1.2.2 Fonction-physiologie des CAs

L'anhydrase carbonique est une protéine enzymatique qui catalyse la réaction réversible d'hydratation du CO_2 / déshydratation de l'acide carbonique H_2CO_3 : $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ ($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). CA9 et CA12 sont des protéines transmembranaires qui jouent un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire en réponse à des conditions hypoxiques et sont de plus impliquées dans l'oncogenèse et la progression tumorale [Badger MR et al. 1994].

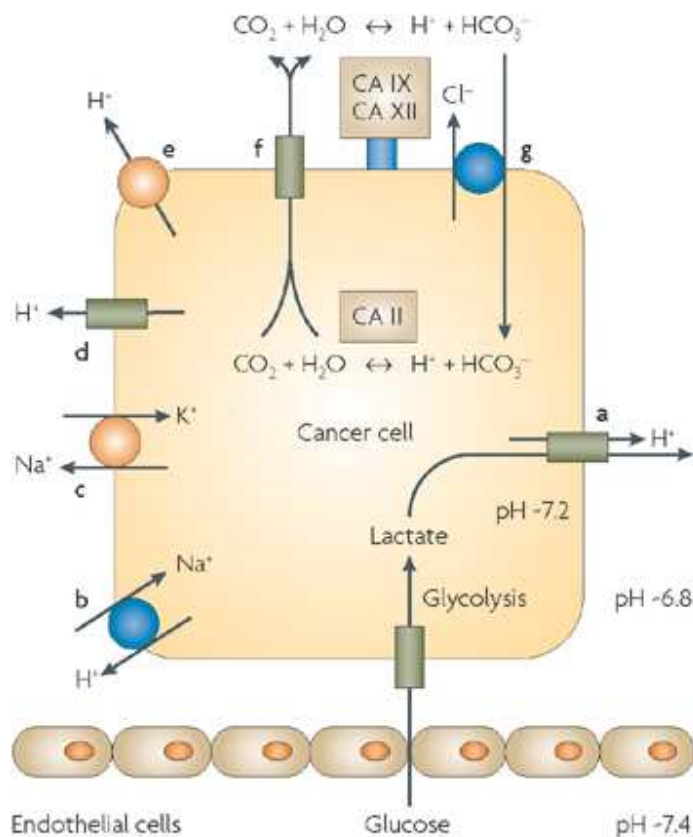
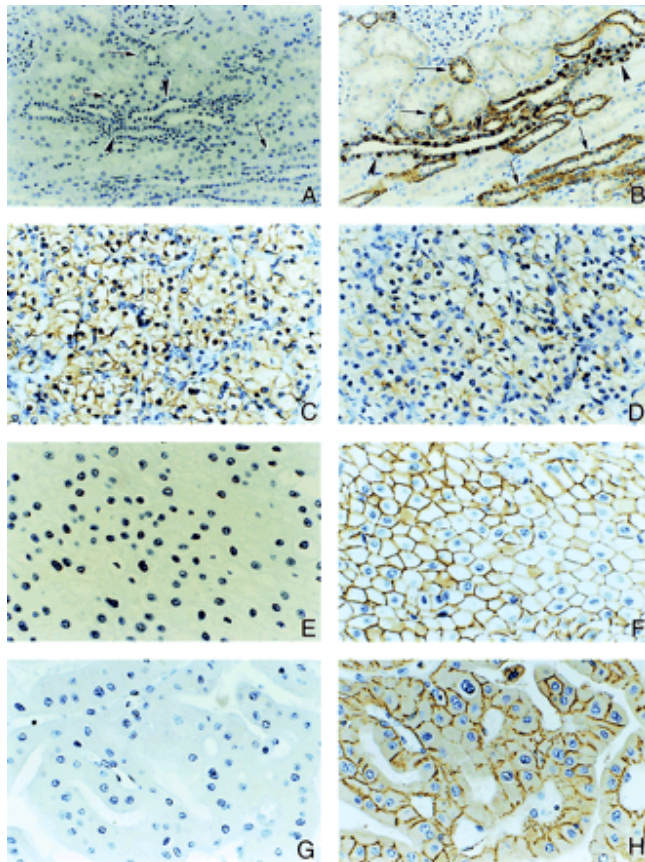


Figure 3. Fonction-physiologie des CA9 et CA12. (Claudiu T. Supuran, Nature Reviews Drug Discovery 2008, 7, S4, 168-181)

2.1.2.3 Détection de CA9 dans les cellules et les tissus

La protéine CA9 n'est pas exprimée dans le rein adulte normal, alors que la protéine CA12 est exprimée dans le tube contourné distal et les cellules intercalées du canal collecteur. Les protéines CA9 et CA12 sont exprimées dans les cellules rénales de CRCC. A l'inverse de CA12, CA9 n'est pas exprimée dans les cellules de CRCH et dans l'oncocytome rénal. La co-expression CA9-CA12 est parfois observée dans les cellules de CRTP. L'utilisation combinée de cette expression en immunohistochimie permettrait d'identifier ces sous-types de CCR [Ivanov S et al. 2001].



- A : CA9 n'est pas exprimée dans le rein adulte normal.
- B : CA12 est exprimée dans le tube contourné distal et les cellules intercalées du canal collecteur dans le rein adulte normal.
- C : CA9 est exprimée dans le CRCC.
- D : CA12 est exprimée dans le CRCC.
- E : CA 9 n'est pas exprimée dans le CRCH.
- F : CA 9 n'est pas exprimée dans l'oncocytome rénal.
- G : CA 12 est exprimée dans le CRCH.
- H : CA 12 est exprimée dans l'oncocytome rénal.

Figure 4. Expression tissulaire des CA dans le tissu rénal sain et dans les CCR. (Ivanov S et al, Am J Pathol. 2001, 158, S3, 905-919)

La cytométrie en flux (CMF) utilisant des anticorps monoclonaux peut détecter l'expression des antigènes de surface des cellules. Li et al ont utilisé l'anticorps monoclonal G250 pour détecter cet antigène dans les lignées cellulaires humaines et dans les tissus rénaux normaux et malins. Les résultats ont montré que l'antigène G250/MN/CA9 est exprimé dans 100% des CRCC, alors qu'il n'est pas exprimé dans les cellules de CRCH, le tissu rénal normal, et le sang de témoins sains [Li et al. 2001].

L'ARNm de CA9 traduit l'activité du gène CA9. Sa détection se fait en biologie moléculaire par la méthode de RT-PCR (reverse transcription polymerase chain

reaction). Li et al ont mesuré l'ARNm de CA9 dans le tissu tumoral de 50 patients présentant une tumeur rénale (30 CRCCs, 9 CRTPs, 5 CRCHs et 6 oncocytomes rénaux), dans 10 tissus rénaux normaux, et dans le sang de 10 témoins sains. Les résultats montrent la détection d'ARNm de CA9 chez 97% des patients atteints de CRCC et chez 56% des patients atteints de CRTP. L'ARNm de CA9 n'est pas trouvé chez les patients atteints de CRCH et d'oncocytome rénal. De plus, l'ARNm de CA9 n'est pas trouvé dans les tissus rénaux normaux et le sang de témoins sains [Li et al. 2003].

La cytologie par aspiration à l'aiguille fine (FNA, fine needle aspiration) des tumeurs rénales sous échographie ou tomodensitométrie est parfois utilisée pour le diagnostic préopératoire. Li et al ont étudié 28 FNA échantillons de patients présentant une tumeur rénale (19 CRCCs, 7 CRTPs, 2 CRCHs et 7 oncocytomes). La cytologie conventionnelle avait une sensibilité de 53% et une spécificité de 71%. Par la méthode RT-PCR, l'ARNm de CA9 était trouvé dans 16/19 échantillons de patients atteints de CRCC et dans 3/7 échantillons de patients atteints de CRTP. L'ARNm de CA9 n'était pas trouvé dans les échantillons de patients atteints de CRCH ou d'oncocytome rénal. La sensibilité de la RT-PCR était de 68% et la spécificité de 100% pour détecter la nature maligne de la tumeur rénale [Li et al. 2006]. L'ARNm CA9 était plus performante que la cytologie pour le diagnostic préopératoire de CRCC.

Li et al ont mesuré le niveau d'ARNm de CA9 dans les tissus tumoraux de patients atteints de CRCC. Les patients atteints de CRCC de stade T1-T2) et / ou de grade Fuhrman I-II avaient un niveau d'ARNm de CA9 plus élevé que ceux de stade T3 et / ou de grade Fuhrman III-IV. Les patients avec métastase viscérale et/ou ganglionnaire avaient un niveau d'ARNm de CA9 moindre que les patients avec CRCC localisé. L'ARNm de CA9 peut compléter le stade TNM et le grade Fuhrman dans l'évaluation du risque métastatique du CRCC [Li et al. 2007].

3. Autres marqueurs moléculaires du CCR

- Vimentine : l'expression de la vimentine est détectée principalement chez les patients atteints de CRCC (51%) et CRTP (61%). Par contre, elle est rarement détectée chez les patients atteints de CRCH (4%) et d'oncocytome rénal (12%). De plus, l'expression de la vimentine est significativement associée à un mauvais pronostic des patients ($P < 0,007$), indépendamment du grade et du stade [Moch H et al. 1999].
- KIT : Pan et al ont analysé l'expression de KIT chez 379 patients atteints de CCR. L'expression de KIT était détectée chez les patients atteints de CRCH (83%) et d'oncocytome (71%). Par contre, elle n'était pas détectée chez les patients atteints d'autres types de CCR [Pan CC et al. 2004]. Le gène KIT était exprimé dans 6/7 CRCHs, 7/8 oncocytomes, 0/15 CRCCs et 1/15 CRTPs [Li G et al. 2005].
- S100A1: l'expression de la S100A1 est détectée dans 2/15 CRCCs, 11/15 CRTPs, 7/8 oncocytomes et 0/7 chromophobe CRCHs [Li G et al. 2005].

Tableau I. Expression de l'ARNm chez des sujets atteints de CRCC, de CRTP, de CRCH, d'oncocytome rénal, de kyste du rein et chez des sujets témoins sains. (Li G et al, Clin Cancer Res. 2003, 15, S9, 6441-6446.)

	No. (%) of samples positive for expression of				
	MN/CA9	Cadherin-6	Vimentin	Mucin 1	Parvalbumin
RCC					
Conventional	29/30 (97%)	28/30 (93%)	18/30 (60%)	17/30 (57%)	3/30 (10%)
Papillary	5/9 (56%)	8/9 (89%)	2/9 (22%)	8/9 (89%)	1/8 (13%)
Chromophobe	0/5 (0%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	4/5 (80%)	5/5 (100%)
Oncocytoma	0/6 (0%)	4/6 (67%)	1/6 (17%)	6/6 (100%)	5/6 (83%)
Normal tissue	0/10 (0%)	9/10 (90%)	0/10 (0%)	3/10 (30%)	5/10 (50%)
Normal blood	0/10 (0%)	1/10 (10%)	Not tested	Not tested	Not tested

4. Recherche de marqueurs moléculaires sériques

La présence d'acides nucléiques extracellulaires dans le flux circulatoire a été rapportée pour la première fois par Mandel et Metais en 1948. [Mandel P et al. 1948] Ils ont montré qu'ils pouvaient être détectés dans le plasma de sujets malades et sains.

Notre hypothèse de travail était que ces recherches pouvaient être appliquées au CCR.

4.1 ARN circulant

Bien que la présence d'ARN circulant ait été rapportée dès les années 70, [Kamm RC et al. 1972, Stroun M et al. 1977], l'idée que l'ARN extracellulaire pouvait résister aux ribonucléases du sérum/plasma n'a pas été aisément acceptée [Kamm RC et al. 1972]. Mais, l'ARN extracellulaire était détecté dans le plasma à des taux de 25,4 à 144 ng/L [Kaznatcheev V et al. 1967, Blinov M et al. 1981] ce qui suggère que l'ARN dans le plasma/sérum est protégé par certains mécanismes. D'autres études ont documenté la présence d'ARN circulant dans le sérum/plasma [Ng EK et al. 2002, Tsui NB et al. 2002]. Sisco a suggéré une liaison entre l'ARN et l'ADN circulants, avec un ADN-ARN hybride qui serait résistant à l'activité RNase et DNase [Sisco KL et al. 2001].

Récemment, la méthode RT-PCR a été développée pour amplifier l'ARNm ce qui augmente la sensibilité et la spécificité de la détection d'ARN dans le plasma [Dasi F et al. 2001, Ng EK et al. 2002]. Plusieurs équipes ont détecté la présence d'ARN circulant dans le sérum de patients atteints de mélanome malin [Kopreski MS et al. 1999, Hasselmann DO et al. 2001], de cancer du sein [Chen XQ et al. 2000] et de cancer du poumon [Fleischhacker M et al. 2001]. L'étude de l'ARN circulant dans le

plasma/sérum est un domaine nouveau pour des applications diagnostiques non-invasives.

4.2 ADN circulant

L'ADN extracellulaire circulant peut-être détecté chez les témoins sains et les sujets atteints d'affections non malignes, par exemple le lupus érythémateux, la polyarthrite rhumatoïde, l'embolie pulmonaire et l'infarctus du myocarde [Galeazzi M et al. 1984, Steinman CR 1984, Steinman CR 1982]. En outre, les traumatismes [Laktionov PP et al. 2004] et procédures thérapeutiques [Davis L et al.1973, Hughes GR et al.1971] peuvent aussi entraîner la libération d'ADN libre dans la circulation. Plusieurs équipes ont démontré des taux élevés d'ADN circulant chez des patients atteints de cancer de l'estomac [Sai S et al. 2007], de l'ovaire [Kamat AA et al. 2006] et de la prostate [Altimari A et al.2008].

4.2.1 Source de l'ADN circulant

Chez les sujets sains, l'ADN circulant peut provenir des lymphocytes ou d'autres cellules nucléées. Chez les sujets cancéreux, l'origine de l'ADN circulant est encore inconnue malgré certaines hypothèses.

- Spontanée

Les lymphocytes activés peuvent libérer de l'ADN in vitro [Anker P et al. 1975]. Cela pourrait expliquer la présence de très faibles concentrations d'ADN circulant chez les sujets sains.

- Lyse des cellules tumorales par micro-métastases

Les cellules tumorales peuvent être détectées par différentes techniques, telles que l'immunocytologie [Moss TJ et al. 1990], la cytométrie de flux [Gross HJ et al. 1995], et la PCR [Mattano LA Jr et al. 1992, Foss AJ et al. 1995]. Le nombre de cellules tumorales n'est cependant pas corrélé avec la quantité totale d'ADN qui nécessiterait un plus grand nombre de cellules que celles isolées par les techniques actuelles [Sorenson GD et al. 1977, Chen X et al. 1999].

- Nécrose cellulaire

La nécrose cellulaire serait un autre mécanisme possible, car des quantités plus importantes d'ADN circulant ont été retrouvées dans le plasma de patients présentant des tumeurs volumineuses et/ou métastatiques [Fujiwara Y et al. 1999, Li CN et al. 2003].

- Apoptose des cellules tumorales

L'apoptose des cellules tumorales constitue une source possible d'ADN circulant. En analyse électrophorétique, l'ADN structural présente des bandes de tailles différentes. L'ADN circulant présente souvent une structure similaire à celle des cellules apoptotiques [Fournie GJ et al. 1999].

4.2.2 Quantification de l'ADN circulant

Il n'existe pas de standard pour la quantification de l'ADN circulant. Dans le passé, cette quantification était réalisée par des tests colorimétriques ou fluorimétriques. Après avoir ajouté le réactif (diphénylamine) au sérum/plasma du patient, le degré de changement chromatique était corrélé avec la concentration d'ADN [Ayala W et al. 1951, Kamm RC et al. 1972]. Les faibles spécificités et sensibilité de ces réactifs ont limité l'utilisation de ces dosages quantitatifs [Lee JB 1963]. Avec des méthodes plus sensibles, par exemple, l'hybridation ADN-ARN, la RIA (analyse radioimmunologique) et l'immunoélectrophorèse, la sensibilité peut être abaissée au niveau du

nanogramme [Steinman CR et al. 1975, Leon SA et al. 1975]. Avec la PCR en temps réel [Laktionov PP et al. 2004, Sozzi G et al. 2003] et la technique PicoGreen® ADN double-brin [Beau-Faller M et al. 2003, Xie GS et al. 2004], il est possible d'abaisser la sensibilité du dosage de l'ADN circulant au niveau du picogramme. Les résultats varient avec les techniques utilisées, la standardisation et les procédures d'analyse. On ne peut donc pas comparer les données entre des études différentes.

4.2.3 Intégrité de l'ADN circulant

L'intégrité de l'ADN circulant est mesurée par le ratio des fragments longs et des fragments courts d'ADN circulant. Chez les témoins sains, l'ADN circulant provient essentiellement des cellules apoptotiques. Les longueurs des fragments d'ADN sont généralement de 185 à 200 bp [Giacona MB et al. 1998]. Cet ADN uniformément tronqué est produit par clivage enzymatique au cours de l'apoptose [Wyllie AH 1980]. Par contre, la taille de l'ADN provenant des cellules malignes varie beaucoup, car outre l'apoptose, la nécrose, l'autophagie sont responsables de la mort des cellules cancéreuses [Jin Z et al. 2005]. La proportion de fragments longs d'ADN circulant peut donc être un bon marqueur pour la détection d'une tumeur maligne [Jahr S et al. 2001]. Wang et al ont démontré que l'intégrité de l'ADN plasmatique était mieux préservée chez les patients atteints de cancers gynécologiques et mammaires que chez les témoins sains [Wang BG et al. 2003]. Chez les patients atteints de cancers prostate, l'intégrité de l'ADN plasmatique aussi augmenté plus que les témoins sains [Hanley R et al.2006]

Jahr S et al utilisé 6% du polyacrylamide gel pour séparer l'ADN plasmatique et les fragments ont ensuite été visualisées après coloration par le bromure d'éthidium. L'intégrité de l'ADN a été mesurée par PCR en temps réel semi-quantitative (i-Cycler) pour déterminer le ratio des PCR produits (400bp/100bp) du gène de l'actine-béta [Wang BG et al. 2003]. Hanley R a utilisé la PCR en temps réel et les sondes TaqMan avec des tailles différentes pour mesurer l'intégrité de l'ADN [Hanley R et al.2006].

5. Les objectifs du travail

Aider au diagnostic précoce du cancer rénal par :

- la méthode de Spectrométrie pour évaluer l'**ARN circulant**
- la méthode de RT-PCR quantitative pour évaluer l'**ARN messenger de CA9**
- la méthode de Spectrométrie et de PicoGreen pour évaluer l'**ADN circulant**
- la méthode PCR traditionnelle pour évaluer l'**intégrité de l'ADN circulant**
- la méthode ELISA pour évaluer la **protéine CA9 circulante**.

PARTIE EXPERIMENTALE

I - Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1 Patients et témoins sains

Les patients inclus dans l'étude ont été recrutés dans le Service d'Urologie du CHU de Saint-Etienne. Les contrôles sains ont été recrutés à l'Etablissement Français du Sang. Tous les patients atteints de CRCC ou d'oncocytome rénal ont eu un diagnostic anatomo-pathologique avec détermination du grade de Fuhrman et classification dans le système UICC. Il n'y avait pas de différence statistique d'âge entre les patients atteints de CCR ou oncocytome rénal et les contrôles.

1.2 Collecte des échantillons

Le sang périphérique des patients a été recueilli avant l'intervention chirurgicale. Chez certains patients, nous avons recueilli du sang périphérique 7 jours après l'opération. 5 millilitres de sang ont été recueillis dans un Serum Separator Tube® (BD, plymouth, UK). Les sérums ont été séparés par centrifugation à 1200 g pendant 10 minutes à 4°C. Les sérums ont été congelés immédiatement à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN ou de l'ADN.

2. Méthodes

2.1 Extraction de l'ARN

Avant l'extraction de l'ARN, le sérum a été centrifugé à 1200 g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les résidus cellulaires éventuels. Nous avons utilisé le Rneasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour extraire l'ARN total du sérum. Le protocole était le suivant : 700 µl de tampon ALT étaient ajoutés à 700 µl de sérum et

vortexés pour obtenir une distribution homogène. 700 µl d'éthanol 70% étaient ajoutés au mélange et homogénéisés avec une pipette. 700 µl du mélange étaient déposés sur une colonne et centrifugés 30 secondes à 10000 g à 4°C. La colonne était lavée avec 700 µl de tampon RW1 et 500 µl de tampon RPE par centrifugation pendant 60 secondes à 10000 g à 4°C. L'ARN était élué 4 fois dans 30 µl d'eau stérile. L'ARN était quantifié par spectrophotométrie à UV à 260 nm et congelé immédiatement à – 80°C.

2.2 Extraction de l'ADN

Avant l'extraction de l'ADN, le sérum était centrifugé à 1200 g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les résidus cellulaires éventuels. Nous avons utilisé le QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour extraire l'ADN total dans le sérum. Le protocole était le suivant : 40 µl de protéinase K et 400 µl du tampon AL étaient ajoutés à 400 µl de sérum, incubés à 56°C 10 minutes pour dissoudre les protéines du sérum. 400 µl d'éthanol 100% étaient rajoutés au mélange. 700µl du mélange étaient déposés sur une colonne et centrifugés 30 secondes à 10000 g à 4°C. La colonne était lavée avec 500 µl de tampon AW1 et 500 µl de tampon AW2 puis l'ADN était centrifugé pendant 30 secondes à 10000 g à 4°C. L'ADN était élué 4 fois dans 50 µl d'eau stérile. L'ADN était quantifié par spectrophotométrie à UV et congelé immédiatement à -20°C.

2.3 Transcription inverse (RT)

La transcription inverse a pour but de transformer l'ARN messager en ADN complémentaire. Parce que l'ARNm possède une queue polyA, nous utilisons une amorce Oligo[dT]₁₂₋₁₈ pour faire débiter le travail de l'enzyme. Puis, nous utilisons une enzyme (SuperScript™ II Reverse Transcriptase) capable de synthétiser une

molécule d'ADNc à partir de l'ARNm. Le thermocycler MASTER CYCLER gradient était utilisé. La RT a été réalisée par le mélange de 12 µl de solution contenant l'ARN total, 1 µl d'Oligo [dT]_{12~18}, 1 µl de dNTP et l'eau stérile. Le premier cycle était de 5 minutes à 65°C. Ensuite, 2 µl de 0.1M DTT et 4 µl de 5X Buffer étaient rajoutés. Après le deuxième cycle (42°C, 2 minutes), 1 µl de SuperScript™ II Reverse Transcriptase étaient rajoutés. Le dernier cycle était de 50 minutes à 42°C, et de 15 minutes à 70°C. L'ADNc était conservé à -20°C.

2.4 RT-PCR one-step

Nous avons utilisé le SuperScript™ One-Step RT-PCR avec Platinum® Taq kit (Invitrogen, California, USA) et le thermocycler MASTER CYCLER gradient. Le volume total à tester était de 50 µl. Le mélange comprenait 25 µl de la solution de 2X Reaction Mix, 1 µl de RT/Platinum® Taq Mix, 1 µl de l'amorce de départ, 1 µl de l'amorce reverse (100 nM de sens et antisens), et 22 µl d'ARN. L'étape de RT se déroulait à 50°C pendant 30 minutes, puis la dénaturation à 94°C pendant 2 minutes, la PCR était réalisée comme suit : dénaturation à 94°C durant 1 minute, les chaînes d'ADN étaient chauffées à 57°C durant 1 minute puis incubées à 72°C durant 1 minute. Ces trois étapes étaient répétées trente quatre fois. La dernière incubation à 72°C durait 5 minutes.

2.5 PCR traditionnelle

Le volume total de la préparation de PCR traditionnelle était de 25 µl. Le mélange comprenait 2 µl d'ADN, 10 µl de MasterMix (5 PRIME, Hamburg), 1 µl de l'amorce de départ, 1 µl de l'amorce reverse (100 nM de sens et antisens), et 11 µl d'eau stérile. Le thermocycler MASTER CYCLER gradient était utilisé. La première étape était la dénaturation à 94°C pendant 2 minutes, le cycle de PCR était le suivant : après dénaturation à 94°C durant 1 minute, les chaînes d'ADN étaient chauffées à 57°C

durant 1 minute et incubées à 72°C durant 1 minute. Ces trois étapes étaient répétées trente fois. La dernière incubation à 72°C durait 1 minute. Pour chaque PCR, un contrôle positif et un contrôle négatif étaient utilisés. Les produits de PCR étaient séparés et visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (1.0%).

2.6 PCR quantitative

L'appareil Applied Biosystem 7500 permet une manipulation rapide et facile. Le grand intérêt de cet appareil est d'analyser 96 puits en même temps, éliminant les différences entre séries. Les puits étaient excités par une longueur d'onde spécifique. La lumière filtrante de la lampe halogène est capable d'exciter le SYBR Green[®]. La longueur d'onde choisie est 494 nm (longueur d'onde maximale d'excitation de l'agent intercalant). Lorsque cette molécule est liée à l'ADN, le SYBR Green[®] émet une forte fluorescence. L'intensité de la lumière sélectionnée est captée par un détecteur photoélectrique. Les signaux électriques sont envoyés au logiciel pour effectuer l'analyse.

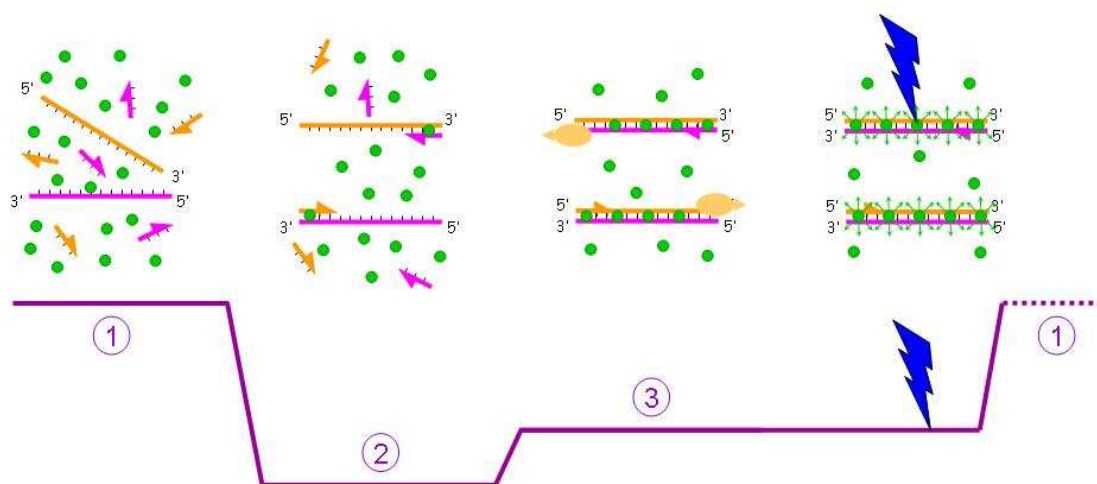


Figure 5. Technique PCR avec SYBR Green[®].

Le volume de la préparation de PCR quantitative était de 25 µl. Le mélange total comprenait 12.5 µl de SYBR Green® PCR Master Mix (QIAGEN S.A.), 1 µl de l'amorce de départ, 1 µl de l'amorce reverse (100 ng de sens et antisens), l'ADN et l'eau stérile. L'appareil ABI Prism 7500 System (Applied Biosystems), effectuait la dénaturation à 95°C pendant 10 minutes, quarante cycles par trois étapes comme suit : 95°C durant 15 secondes, 58°C durant 15 secondes et 72°C durant 33 secondes. Pour chaque étape à 72°C, la fluorescence en SYBR® Green était observée. Le dernier cycle de dissociation se faisait à 95°C durant 15 secondes, 60°C durant 60 secondes, and 95°C durant 15 secondes. Chaque produit de PCR était étudié par électrophorèse sur gel d'agarose.

2.7 Electrophorèse

Le gel d'agarose (1.0%) comprend 0.5 g d'agarose, 50 ml de Tris-Borate-EDTA-Buffer (5.0%) et 5 µl de bromure d'éthidium (BET). Le voltage de l'électrophorèse était de 100V et le temps de l'électrophorèse de 25 minutes. Les fragments d'ADN étaient visualisés et photographiés sous lumière UV avec coloration par le BET. Les bandes séquentielles d'ADN standard servaient de marqueur. La position des produits de PCR par rapport à la position des bandes séquentielles d'ADN standard, les tailles des produits de PCR étaient précisées.

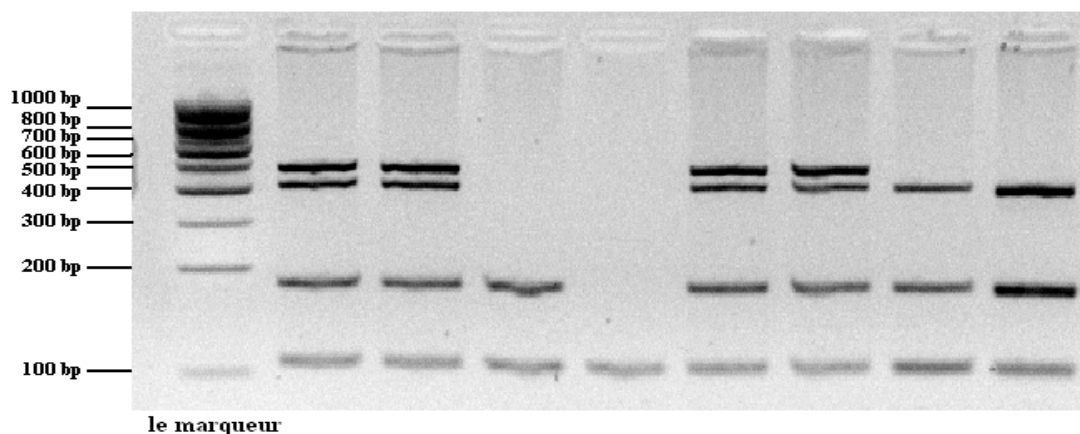


Figure 6. Tailles des différentes bandes d'ADN standard sur gel d'agarose.

2.8 Mesure de l'intégrité de l'ADN circulant

Le gène GAPDH était utilisé comme gène de référence dans les différents tests. La localisation du gène GAPDH est en 12p13 sur le chromosome 12. La longueur de la séquence du gène GAPDH est 3880 bp. Pour mesurer l'intégrité de l'ADN circulant, quatre amorces étaient construites. Les tailles des produits de ces amorces sont différentes. GAPDH 1 (109bp) était utilisé comme contrôle de la qualité de l'ADN circulant. L'intégrité de l'ADN circulant s'exprime par le ratio de GAPDH4 / GAPDH1, GAPDH3 / GAPDH1 et GAPDH2 / GAPDH1. Plus le ratio GAPDH4 / GAPDH1 est élevé, plus l'intégrité de l'ADN circulant est conservée.

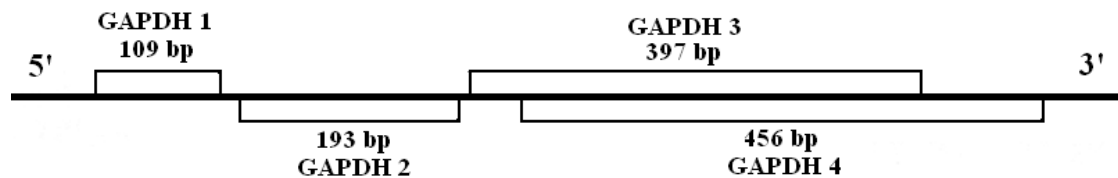


Figure 7. Localisations des amorces de GAPDH.

Tableau II. Séquences des amorces de GAPDH.

		Sequences	Fragment (bp)
GAPDH-1	forward	AAAGGACATTTCCACCGCAA	109
	reverse	GGTCGGGTCAACGCTAGGCT	
GAPDH-2	forward	CCCATCCCTTCTCCCCACAC	193
	reverse	CAAGCCCACCCCTTTCTAAG	
GAPDH-3	forward	TAGAGAAGGGGTGGGCTTGC	397
	reverse	CCCTAGGCCACCTCCCCATTA	
GAPDH-4	forward	GGCTTGCCCTGTCCAGTTAAT	456
	reverse	CGCCCAATACGACCAAAT	

2.9 PicoGreen® assay

Le réactif PicoGreen® est un colorant spécifique cyanine asymétrique. Le colorant libre n'est pas fluorescent, mais après liaison à l'ADN double-brin, il exprime une fluorescence 1000 fois plus forte. Le PicoGreen® est 10.000 fois plus sensible que la méthode d'absorbance UV, et beaucoup plus sélectif de l'ADN double-brin que de l'ADN simple-brin et de l'ARN. Le PicoGreen® assay minimise ainsi la contribution de la fluorescence de l'ARN et de l'ADN simple-brin. Le PicoGreen® assay permet de quantifier seulement 25 pg/ml d'ADN double-brin par un spectrofluoromètre. Le premier, préparé en 1X TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) vient d'un stock de 20X TE. Ensuite, le standard de l'ADN est dilué à des concentrations de 100 µg/ml à 2 µg/ml par 1X TE buffer. 1 µl du sérum et 99 µl de 1X TE buffer sont rajoutés dans les puits des microplaques. Une dilution de 1:200 de réactif PicoGreen® pour 1X TE buffer est préparée. 100 µl de PicoGreen® dilué dans chaque puits de microplaque sont rajoutés et incubés pendant 2-5 minutes à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin, est réalisée une mesure par le spectrofluoromètre.

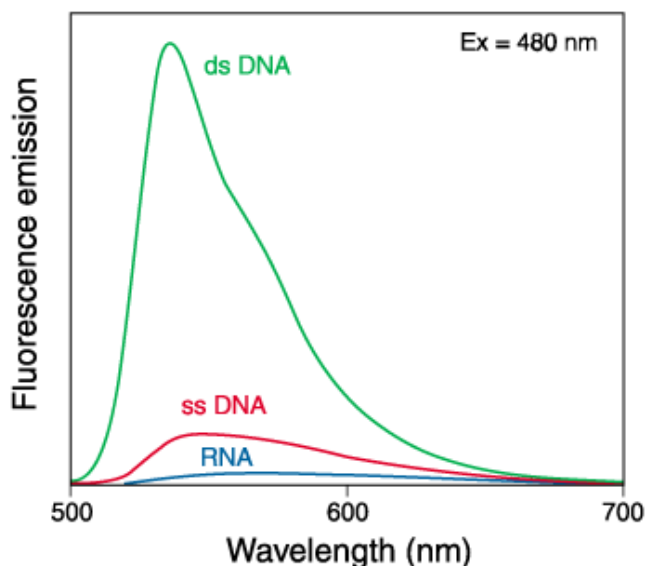


Figure 8. Courbes de fluorescence de PicoGreen® avec l'ARN (RNA), l'ADN double-brin (ds DNA) et l'ADN simple-brin (ssDNA).

2.10 Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay (ELISA)

L'ELISA est une technique biochimique qui utilise un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit avec les complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi entraîner l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène. L'ELISA pouvant être utilisé tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un outil efficace à la fois pour déterminer des concentrations sériques d'anticorps (comme pour le test HIV ou le virus du Nil), et pour détecter la présence d'un antigène. C'est un test simple, facile d'emploi et peu coûteux. Il est limité par la disponibilité des anticorps d'intérêt.

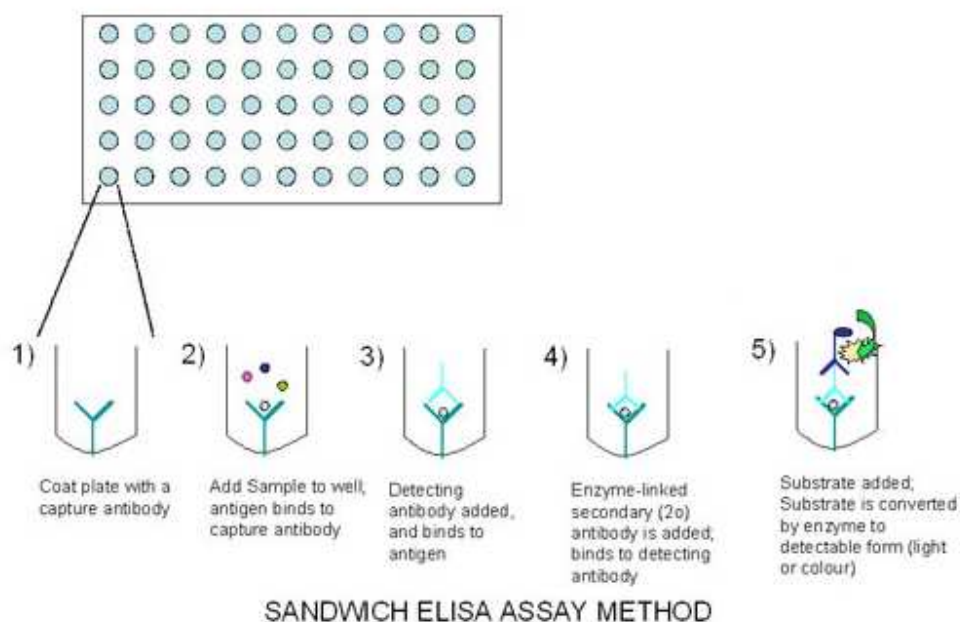


Figure 9. Technique ELISA en sandwich.

Le Quantikine® Human Carbonic Anhydrase IX/CA9 Immunoassay utilise l'ELISA en sandwich pour détecter un antigène dans le sérum ou dans tout autre échantillon. Cette technique est d'un usage très courant en recherche. Le protocole est réalisé

comme suit : 50 µl d'Assay Diluent RD1-21 sont rajoutés dans chaque puits, puis 100 µl du contrôle ou du sérum, suivi d'une incubation pendant 2 heures à la température ambiante. Chaque puits est aspiré et lavé par 400 µl de tampon de lavage trois fois. 200 µl de conjugué d'Anhydrase Carbonique IX sont rajoutés dans chaque puits, suivi d'une incubation pendant 2 heures à la température ambiante. Après aspiration et lavage comme précédemment, 200 µl de solution de substrat sont rajoutés dans chaque puits, et incubés pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. 50 µl de solution d'arrêt sont rajoutés dans chaque puits et mesurés à la longueur d'onde de 450 nm par le lecteur de microplaques.

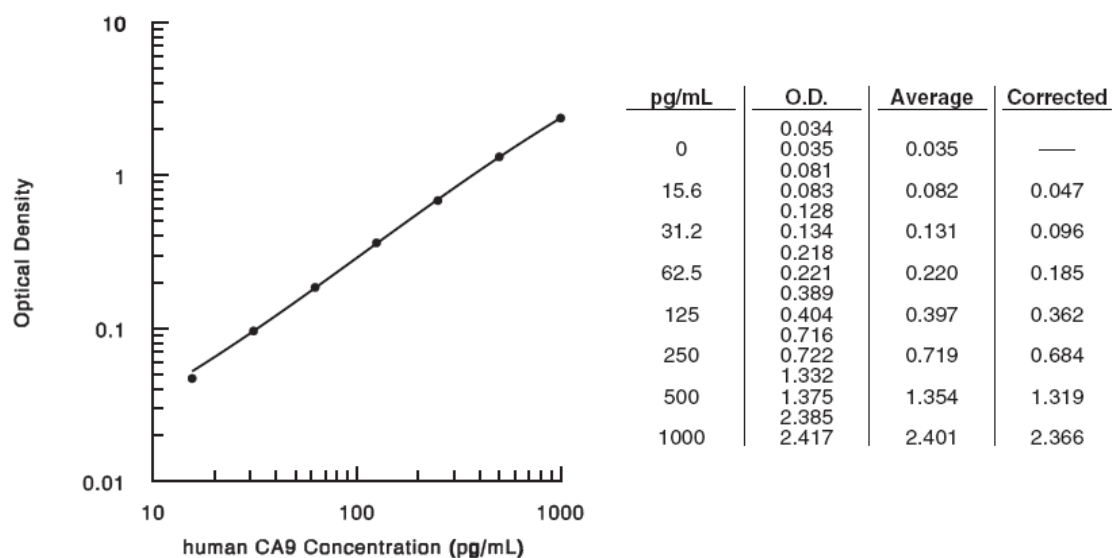


Figure 10. Courbe standard des densités optiques en ELISA pour le CA9.

II- Résultats

1. Premier article

Anticancer Research, 2008, 28, 321-326

Elevated Serum-circulating RNA in Patients with Conventional Renal Cell Cancer

Gang Feng^{1,2}, Guorong Li², Anne Gentil-Perret³, Jacques Tostain², Christian Genin¹

1. Clinical Immunology Laboratory

2. Department of Urology

3. Department of Pathology, CHU of Saint-Etienne, Faculty of Medicine Jacques Lisfranc, University JEAN-MONNET.

ANTICANCER RESEARCH	
International Journal of Cancer Research and Treatment	
ISSN: 0250-7003	
Volume 29, Number 5, May 2009	
Clinical Studies	
Contents	
Human Papillomavirus Infection as a Prognostic Factor in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas Treated in a Prospective Phase II Clinical Trial: S. JO, A. JIHAZ, K. ZHANG, C. BUEL, S. LOFRA, S.P. WILCZYNSKI, Y. YEN, X. LIU, J. BELLENHORN, D. LHM, R. POZ, G. SORRE, N. VORA, S. SHRAJA (Dakar, CA, USA).....	1407
Urokinase-type Plasminogen Activator and Plasminogen-activator-inhibitor Type 1 Predict Metastases in Good Prognosis Breast Cancer Patients: P. DE CREMOUX, I. GRANDIN, Y. DIFRAS, A. SAVIGNONI, A. DIEZFORGES, R. SALMON, M.A. BOLLET, F. REYAL, B. SIGAL-ZAFRANI, A. VINCENTI-SALOMON, X. SASTRE-GARAU, B. MAGDELENAU, I. MIGNOT, A. FORQUET, ON BEHALF OF THE BREAST CANCER STUDY GROUP OF THE INSTITUT CURIE (Paris, France).....	1415
A Randomized Controlled Trial Investigating the Effects of Celecoxib in Patients with Localized Prostate Cancer: P. SOORIYAKUMARAN, H.M. COLEY, S.B. FOX, P. MACANAS-PRIARD, D.P. LUVELL, A. BENDERSON, C.G. EDEN, P.D. MILLER, S.E.M. LANGLEY, R.W. LAING (Guldford, Redhill, Surrey, Haddington, Oxford, UK).....	1403
EBF-1.4 Expression Alterations in Primary Colorectal Cancers and Their Corresponding Metastases: I. LUSINDER, B. MALMER, M. ISAKSSON-METTAVAINO, Å. ÖBERG, R. BENCKSSON, E. STENLUND, R. PALMQUIST (Umeå, Malmö, Sweden).....	1409
Colonic Tumor versus Multiphenotypic Differentiation: A Case of Carcinoma with Features of Colonic and Lung Primary Tumors: P. MURTHAI, A.M. TRUSKINOVSKY, S. SHAI, A.Z. DUEK (Montreal, MN, USA).....	1405

1.1 Introduction

Des résultats récents ont confirmé que l'ARN est retrouvé dans la circulation. L'ARN sérique ou plasmatique est apparu comme un marqueur potentiel pour le diagnostic et la surveillance du cancer. Dans cette étude, nous avons quantifié le niveau de l'ARN circulant chez les patients présentant un CRCC.

Le but de notre étude était d'évaluer si le niveau de l'ARN circulant pouvait discriminer les patients avec cancer rénal des sujets sains et si le niveau de l'ARN circulant pouvait être utilisé comme marqueur tumoral pour la détection des CRCC.

Elevated Serum-circulating RNA in Patients with Conventional Renal Cell Cancer

GANG FENG^{1*}, GUORONG LI^{1,2*}, ANNE GENTIL-PERRET³, JACQUES TOSTAIN² and CHRISTIAN GENIN¹

¹Clinical Immunology Laboratory and Departments of ²Urology and ³Pathology, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, France

Abstract. *Background:* Reliable serum biomarkers for differential diagnosis of conventional renal cell carcinoma (RCC) are highly desirable. Recent studies have confirmed the stability of circulating RNA in serum of cancer patients. The purpose of our study was to evaluate whether the amounts of circulating RNA could discriminate between conventional renal cancer patients and healthy individuals as a tumor marker. *Patients and Methods:* A total of 71 patients with conventional RCC, 12 with renal oncocytomas and 44 healthy individuals entered into this study. Serum samples were taken and subjected to RNA extraction. The amount of RNA was quantified spectrophotometrically. Additionally, 9 serum samples from conventional RCC were also studied one week after nephrectomy. Diagnostic performance of RNA concentration was calculated through the receiver operating characteristic (ROC) curve to distinguish between conventional RCC and healthy individuals. *Results:* The mean level of RNA in conventional RCC (1414.19 ± 91.95 ng/ml) was significantly higher than that in healthy individuals (520.49 ± 39.75 ng/ml, $p < 0.0001$) and these with renal oncocytomas (560.71 ± 69.54 ng/ml, $p < 0.0001$). Among the conventional RCC, there was no significant difference in circulating RNA levels in terms of tumor stage, grade or size. The area under the ROC curve was 0.956 (95% confidence interval, 0.923 to 0.989), indicating an acceptable sensitivity and specificity as a tumor marker. For conventional RCC, the RNA level was reduced significantly ($p < 0.0001$) one week after nephrectomy. *Conclusion:* The data suggest that elevated circulating RNA may be a valuable diagnostic tool for discriminating

conventional RCC patients from normal individuals or from these with renal oncocytoma. Elevated serum circulating RNA provides a new research area as biomarker for the diagnosis of conventional RCC.

The wide use of ultrasound and computed tomography has been successful in detecting renal tumors. As a result, many renal tumors without symptoms are found. However, nearly 30% of patients present with metastatic disease at the time of diagnosis, and 30-40% of patients will metastasize after surgery. The percentage of benign renal masses, such as renal oncocytoma, is equally rising. There is an apparent need to find serum markers to improve the differential diagnosis and monitoring of renal cancer after operation. Unfortunately, as yet there is no serum marker available.

Identification and characterization of the genetic changes that drive renal cancer development and progression have provided us with a variety of molecular markers. Specific genetic changes have been found in renal tumors. The VHL gene is known as a gatekeeper gene for conventional RCC (1). In a high percentage of conventional RCC, one inherited allele of the VHL gene is mutant, while the second allele is deleted. These findings have greatly advanced our understanding of renal tumor growth and progression. However, these markers have not transformed into clinical use for diagnosis of renal cancers, either because they lack sensitivity, or because the molecular assays are too cumbersome. To date there is no molecular marker that can be used in the clinic for renal cancer diagnosis.

Circulating cell-free nucleic acids have attracted much interest. Recent results have confirmed that the presence of cell-free circulating RNA is a ubiquitous phenomenon (2-6). Serum or plasma RNA has emerged as a potential biomarker for cancer detection and monitoring. In this study, we quantified the circulating RNA level in conventional RCC. The purpose of our study was to evaluate whether the amounts of circulating RNA could discriminate between renal cancer patients and healthy individuals as a tumor marker for detection of conventional RCC.

*Both authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Guorong Li, MD, Ph.D., Associate Professor, Department of Urology, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 2, France. Tel: +33 4 77 82 88 14, Fax: +33 4 77 12 05 52, e-mail: glli2001@yahoo.fr

Key Words: Serum, circulating RNA, renal cancer, diagnosis.

Patients and Methods

Study participants. A total of 71 patients with conventional RCC and 12 with renal oncocytomas entered into this study. All patients with a renal tumor had pathological diagnosis. Conventional RCC was graded and staged according to the UICC system (7, 8). Forty-four healthy individuals were used as controls. Their clinical data are summarized in Table I. There was no statistical difference in age between the conventional RCC patients and the healthy individuals.

This study was approved by the local institutional ethic committee. The patients received the necessary information concerning the study and their consent was obtained.

Collection of serum samples. Blood samples were collected before surgical operation. Five milliliters of blood were collected and managed within 5 hours. The blood tube was centrifuged at 1200 xg for 10 minutes at 4°C, followed by careful separation of the serum. The serum was stored at -80°C before use.

Extraction and measurement of RNA. The serum was centrifuged again before the extraction of RNA; 700 µl of serum was used. The extraction of total RNA was performed using an RNeasy mini kit according to the manufacturer's instructions with some modifications (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). Briefly, 700 µl GITC-containing solution (RLT buffer) was used to dissolve the serum. 700 µl of 70% ethanol was added. The solution was washed twice using buffer provided in the kit. The RNA was eluted in 30 µl RNase-free water and then quantified using UV spectrophotometry at 260 nm. The amount of RNA was calculated as ng/ml. The RNA specimens were stored at -80°C until reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RT-PCR. To examine if the RNA was feasible for RT-PCR, RT-PCR of GAPDH using serum samples from conventional RCC cancer and healthy individual was performed. Ten microliters of RNA was reversely transcribed into cDNA using the SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Paisley, UK). PCR was performed in a 25 µl reaction mixture containing 1 µl of cDNA, 5 µl 10X PCR buffer, 1 µl of 10 mM dNTP mix, 1.5 µl of 50 mM MgCl₂, 100 ng of both sense and antisense primers, and 1.25 U of *Taq* polymerase (Eppendorf, Hamburg, Germany). We designed GAPDH primers (109 bp): sense primer 5'-AAA GGA CAT TTC CAC CGC AAA-3' and antisense primer 5'-GGT CGG GTC AAC GCT AGG CT-3'. These primers were designed to span the splice junction so that genomic DNA contamination could be monitored. After a denaturing step at 94°C for 3 min, PCR was performed with denaturing temperature at 94°C for 1 min, annealing temperature at 57°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. Thirty-five cycles were performed. For each PCR, a positive control and a negative control without cDNA were used. PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. DNA fragments were visualized and photographed under UV light with ethidium bromide staining. The expected band for GAPDH was identified by a co-migration of a DNA marker ladder electrophoresed in an adjacent lane.

Statistical analysis. Statistical analysis was based on the SPSS v13 software package (Chicago, USA). Statistics were carried out using

Table I. Characteristics of study population.

	No. of cases (%)	
Conventional RCC patients (N=71)		
Gender		
Male	45	63.4%
Female	26	36.6%
Age (years)		
Range	35-86	
Median	66	
TNM		
T1	30	42.3%
T2	5	7.0%
T3	36	50.7%
Grade		
G1	12	(16.9%)
G2	32	(45.1%)
G3	22	(31.0%)
G4	5	(7.0%)
Renal oncocytoma patients (N=12)		
Gender		
Male	4	33.4%
Female	8	66.6%
Age (years)		
Range	27-76	
Median	58	
Individuals without a tumor (N=44)		
Gender		
Male	36	81.8%
Female	8	18.2%
Age (years)		
Range	50-80	
Median	64	

Mann-Whitney and non-parametric Kruskal-Wallis tests to compare RNA levels of two or more groups and explore the relationship of RNA levels with gender, age, tumor stage, grade and size, respectively. *T*-tests of paired samples were performed to compare the difference between pre- and postoperation groups. A *p*<0.05 was considered significant. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to test the diagnostic performance. The area under the ROC curve is a measure of the overall ability to distinguish between the conventional RCC patients and the healthy individuals.

Results

The characteristics of the study population are summarized in Table I. The median age was 66 years for the conventional RCC patients, 58 years for patients with renal oncocytomas and 64 years for the healthy individuals. Table II summarizes the levels of circulating RNA in different groups. Age and gender were not associated with serum RNA amounts. Among the conventional RCC patients, no

Table II. RNA levels in different groups.

	No. of cases	Serum RNA (ng/mL)	P-value
Patients			
Age			0.397
≤50	11	1682.14±301.78	
51-69	33	1423.92±151.95	
≥70	27	1293.12±95.71	
Gender			0.821
Male	45	1478.02±139.10	
Female	26	1303.71±70.23	
Stage			0.905
T1	30	1476.19±170.26	
T2	5	1225.71±195.27	
T3	36	1388.69±111.69	
Grade			0.793
1	12	1264.29±122.79	
2	32	1440.85±165.95	
3	22	1360.71±81.24	
4	5	1838.57±648.19	
Tumor size			0.182
<4 cm	23	1365.06±208.47	
4-8 cm	32	1441.41±89.21	
>8 cm	16	1430.36±224.09	
Renal oncocytoma patients			
Gender			0.808
Male	4	625.25±182.84	
Female	8	512.95±57.07	
Individuals without a tumor			
Gender			0.445
Male	36	503.79±43.13	
Female	8	595.67±102.67	

significant association was observed between the RNA amounts and gender, age, tumor stage, grade or size.

Figure 1 shows the mean values of circulating RNA. The mean value of circulating RNA in conventional RCCs (1414.19±91.95 ng/ml) was significantly higher than that in healthy individuals (520.49±39.75 ng/ml, $p<0.0001$) and that in patients with renal oncocytomas (560.71±69.54 ng/ml, $p<0.0001$). The mean values were not significantly different between healthy individuals and patients with renal oncocytomas ($p=0.617$).

Figure 2 shows that the area under the ROC curve was 0.956 (95% confidence interval, 0.923 to 0.986), suggesting a strong discriminatory power between the conventional RCC patients and healthy individuals. Table III lists few circulating RNA level cut-offs used to generate the curves with their sensitivity and specificity.

Figure 3 shows the reduction of circulating RNA of patients with conventional RCC one week after nephrectomy. The mean values before surgery (1301.39±184.81 ng/ml)

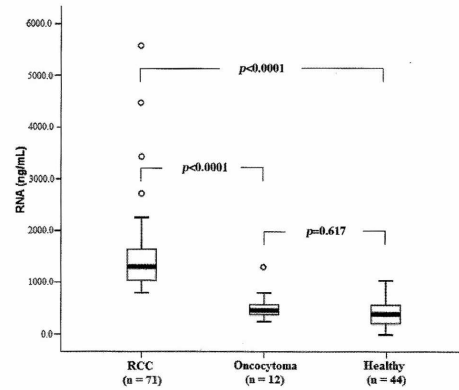


Figure 1. Box-and-whisker plots of RNA levels in conventional RCC, those with renal oncocytoma and healthy individuals. The Mann-Whitney test was performed. The mean value of serum circulating RNA in patients with conventional RCC was significantly higher than that in healthy individuals or patients with renal oncocytoma.

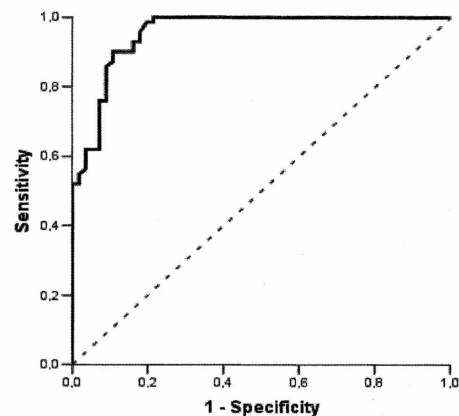


Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curve for serum RNA level. The area under the curve (AUC) was 0.956 (0.923-0.986).

were significantly reduced one week after nephrectomy (815.47±188.50 ng/ml, $p<0.0001$).

The circulating RNAs were amplifiable by RT-PCR. Results were confirmed by specific intron-spanning primer of GADPH with a product size of 109 bp visualized in 1.5% agarose gel for cancer and control serum (Figure 4). The

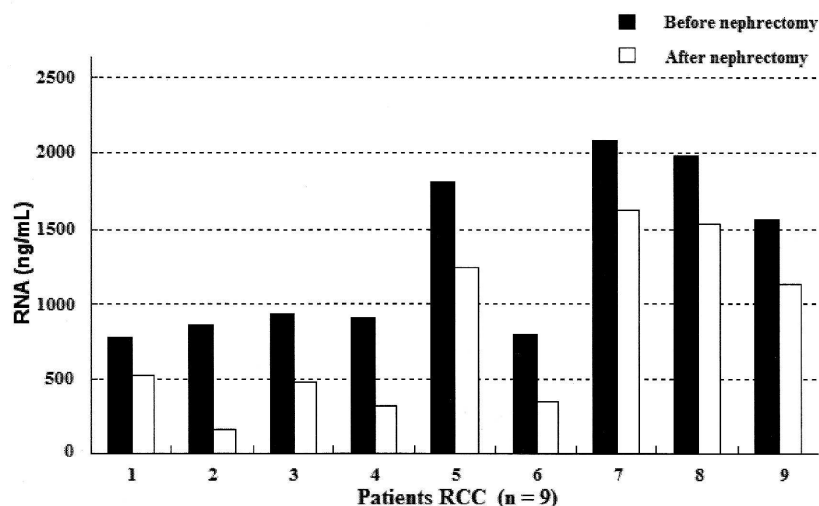


Figure 3. Serum pre- and post-operative RNA levels. The pre- and postoperative serum RNA values in nine conventional RCC patients are shown.

bands observed from serum from patients with conventional RCC were generally more intensive than those observed in healthy individuals, indicating the difference in amounts of RNA.

Discussion

Conventional RCC is solely diagnosed by imaging examinations. There is no serum marker. Circulating nucleic acids are being studied as a potential powerful tool for detection of cancer. Circulating DNA is studied in several cancers (9-12). Traditionally, circulating RNA was thought to be unstable or degraded by RNase in serum (13, 14). However, recent pioneers have demonstrated the stability of circulating RNA in serum although the mechanism is not completely clear (2-6). Li and Lo have confirmed the unexpectedly stable RNA in serum of cancer or other patients (4, 5). Several authors have claimed that analysis of cell-free circulating RNA has offered new promises for noninvasive diagnosis (2-6). We thought to investigate whether the serum level of circulating RNA could be used as a molecular marker for conventional RCC.

To our knowledge, this is the first report to provide straightforward evidence that the circulating RNA was significantly elevated in the serum of conventional RCC patients. To evaluate the accuracy of RNA quantification assays, we constructed a ROC curve. The test discriminated

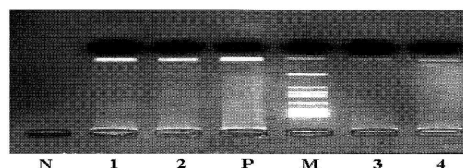


Figure 4. Detection of GADPH of serum samples. GADPH (109 bp) was detectable in serum of conventional RCC and normal controls. Lanes 1 and 2 were for conventional RCC, lanes 3 and 4 for healthy individuals. Lane M was for the molecular marker, P for positive control and N for negative control.

Table III. Screening performance of serum RNA level.

RNA (ng/ml)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
696	100	79
889	87	89
1023	70	93
1200	52	100

AUC ROC=0.956 (95% confidence interval, 0.923-0.989).

between conventional RCC and healthy individuals. The measurement of circulating RNA produced an acceptable sensitivity and specificity for the diagnosis of conventional

RCC. Sensitivity and specificity were better when the levels of cell-free DNA were used as a tumor marker in other cancers (10-12). There was no difference in circulating RNA level in terms of tumor size, tumor stage or tumor grade. Our data indicated that elevated serum RNA levels appeared in early stage, low-grade and small tumor-sized conventional RCC. Taken together, we thought that quantification of RNA amounts in the serum of renal cancer patients, once a cut-off value is established, may be a valuable tool to distinguish between conventional RCC patients and unaffected individuals and may be proposed as an early detection test. Increased serum RNA might prompt more accurate and specific clinical examination.

To further evaluate the clinical potential of circulating RNA as a tumor marker for conventional RCC, we also analyzed the level of serum RNA after nephrectomy. A significant reduction of serum-circulating RNA was observed one week after operation. The significant reduction after tumor removal provides grounds that the increased RNA may originate from the tumor itself. This result also provides evidence that the RNA level may serve as a tumor marker for monitoring after operation. It would be of interest to perform a follow-up study on these patients to investigate the relationship between the RNA level and tumor recurrence.

One of the difficulties in differential diagnosis of renal tumors is between conventional RCC and renal oncocytoma. Renal oncocytoma becomes a commonly encountered benign renal tumor. Surgery, *i.e.* a radical or partial nephrectomy, should be performed in conventional RCC, while a partial nephrectomy or watchful waiting can be applied to the benign oncocytoma. It is obvious that the distinction of each subtype is clinically meaningful. However, the differentiation of some solid renal tumors can be impossible in spite of imaging advances. Recent publications suggest a possible role of preoperative biopsy for management of these renal tumors (15). Our data suggested that the amounts of serum RNA in conventional RCC was significantly higher than that in renal oncocytomas. The measurement of circulating RNA in serum may be potentially used as a marker for the differential diagnosis. On the contrary, we observed no difference in serum RNA levels between patients with renal oncocytomas and healthy individuals. Our observation indicated that different tumor types may result in different levels of serum RNA. Further studies are necessary to elucidate the mechanism of discharge of RNA from tumors into the circulation.

Our finding is important because our methods are routinely used in clinical laboratories. Quantification of RNA is commonly performed using spectrophotometry in clinical laboratories. Several studies have used sensitive quantitative PCR of a housekeeping gene to quantify the circulating nucleic acids (16-20). Although the technique of

quantitative PCR is promising, it is not a standard assay. The major problems include variability of RNA templates and assay designs and protocols. We emphasized our efforts in the serum RNA extraction process. As a result, the total RNA can be quantified easily and correctly by spectrophotometry. Kamm and Smith reported in 1972 an RNA concentration of 144 ± 22 ng/ml in the plasma of healthy individuals (21). We used a new RNA extraction method, which may significantly increase the yield. If our results are confirmed by other groups, this simple technique can easily be implemented into clinical application for cancer diagnosis.

Further characterization of serum-circulating RNA is necessary to improve our understanding and to increase clinical applications (20-23). Firstly, the present study and others have shown that circulating RNAs in serum are perfectly feasible for RT-PCR amplification (16-20). This will certainly open new avenues for cancer detection and follow-up since serum samples are easily obtainable and non-invasive. Secondly, our findings raise the possibility that an elevated serum RNA level may also appear in other types of cancers. This would have potential effect in the diagnosis of many cancer types that are currently without specific molecular markers.

Conclusion

We believe that the serum-circulating RNA is highly elevated in conventional RCC. The elevated circulating RNA in serum in conventional RCC may be a valuable diagnostic tool for discriminating conventional RCC patients from unaffected individuals and those with renal oncocytoma. The analysis of serum RNA provides a new research area as a biomarker for diagnosis of conventional RCC.

Acknowledgements

This research was supported by the Comité Départemental de la Loire de la Ligue Contre le Cancer. Dr. Li was supported by the PHRC (French Ministry of Health) and l'INCa Cancéropôle CLARA. The authors thank D. Laurent and F. Cognasse of EFS Auvergne-Loire for the collection of serum samples.

References

- 1 Sutphin PD, Chan DA, Li JM, Turcotte S, Krieg AJ and Giaccia AJ: Targeting the loss of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in renal cell carcinoma cells. *Cancer Res* 67: 5896-5905, 2007.
- 2 Chan KCA and Lo YMD: Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers. *BJC* 96: 681-685, 2007.
- 3 Swarup V and Rajeswari MR: Circulating (cell-free) nucleic acids – a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett* 581: 795-799, 2007.

- 4 Li Y, Elashoff D, Oh M, Sinha U, St John MA, Zhou X, Abemayor E and Wong DT: Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. *J Clin Oncol* 24: 1754-1760, 2006.
- 5 Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gerovassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR and Ding C: Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nature Med* 13: 218-223, 2007.
- 6 Bremnes RM, Sirera R and Camps C: Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer* 49: 1-12, 2005.
- 7 Sobin H and Wittekind CH (eds.). *International Union Against Cancer, UICC, in TNM Classification of Malignant Tumors*, 6th edition. New York, Wiley-Liss, 2002.
- 8 Fuhrman SA, Lasky LC and Limas C: Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinomas. *Am J Surg Path* 6: 665-663, 1982.
- 9 Ziegler A, Zangemeister-Wittke U and Stahel RA: Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treatment Reviews* 28: 255-271, 2002.
- 10 Flamini E, Mercatali L, Nanni O, Calistri D, Nunziatini R, Zoli W, Rosetti P, Gardini N, Lattuneddu A, Verdecchia GM and Amadori D: Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12: 6985-6988, 2006.
- 11 Boddy JL, Gal S, Malone PR, Harris AI and Wainscoat JS: Prospective study of quantitative of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant *versus* benign prostate disease. *Clin Cancer Res* 11: 1394-1399, 2005.
- 12 Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, Pierotti MA and Tavecchio L: Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 61: 4675-4678, 2001.
- 13 Reddi K and Holland JF: Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *PNAS* 73: 2305-2310, 1976.
- 14 Sheid B, Lu T, Pedrinan L, Nelson JH: Plasma ribonuclease: a marker for the detection of ovarian cancer. *Cancer* 39: 2204-2208, 1997.
- 15 Neuzillet Y, Lechevallier E, Andre M, Daniel L and Coulange C: Accuracy and clinical role of fine needle percutaneous biopsy with computerized tomography guidance of small (less than 4.0cm) renal masses. *J Urol* 171: 1802-1805, 2004.
- 16 Rykova EY, Wunsche W, Brizgunova OE, Skvortsova TE, Tamkovich SN, Senin IS, Laktionov PP, Sczakiel G and Vlassov VV: Concentration of circulating RNA from healthy donors and cancer patients estimated by different methods. *Ann New York Acad Sci* 1075: 328-333, 2006.
- 17 Garcia V, García JM, Peña C, Silva J, Domínguez G, Hurtado A, Alonso I, Rodríguez R, Provencio M and Bonilla F: Thymidylate synthase messenger RNA expression in plasma from patients with colon cancer: prognostic potential. *Clin Cancer Res* 12: 2095-2100, 2006.
- 18 Wong SC, Lo SF, Cheung MT, Ng KO, Tse CW, Lai BS, Lee KC and Lo YM: Quantification of plasma β -catenin mRNA in colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Cancer Res* 10: 1613-1617, 2004.
- 19 Cheung ST, Liu CL, Chow JP, Lee YT, Ip YC, Ho JC and Fan ST: Preoperative plasma transcript AA454543 level is an independent prognostic factor for hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Neoplasia* 8: 696-701, 2005.
- 20 Miura N, Nakamura H, Sato R, Tsukamoto T, Harada T, Takahashi S, Adachi Y, Shomori K, Sano A, Kishimoto Y, Ito H, Hasegawa J and Shiota G: Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Sci* 97: 1366-1373, 2006.
- 21 Kamm RC and Smith AG: Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem* 18: 519-522, 1972.
- 22 Fleischhacker M: Biology of circulating mRNA, Still more questions than answers? *Ann New York Acad Sci* 1075: 40-49, 2006.
- 23 Wong BC, Chan KC, Chan AT, Leung SF, Chan LY, Chow KC and Lo YM: Reduced plasma RNA integrity in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 12: 2512-2516, 2006.

Received September 24, 2007

Revised November 14, 2007

Accepted December 11, 2007

1.2 Discussion

Dans la littérature, il n'existe aucun biomarqueur sérique pour le diagnostic du CRCC.

Cet article est le premier à indiquer que le niveau de l'ARN circulant est significativement plus élevé dans le sérum des patients atteints de CRCC que dans celui des sujets sains, sans corrélation avec l'âge, le stade TNM, le grade Fuhrman, et la taille de la tumeur. Le niveau d'ARN circulant peut donc être utilisé comme biomarqueur sérique pour le diagnostic du CRCC. L'une des difficultés devant une tumeur solide du rein réside dans le diagnostic différentiel entre CRCC et oncocytome rénal. Nos données suggèrent que le niveau d'ARN circulant est plus élevé dans le CRCC que dans l'oncocytome rénal. Le type tumoral semble donc influencer sur le niveau de l'ARN circulant. D'autres études sont nécessaires pour élucider le mécanisme de la décharge dans la circulation de l'ARN d'origine tumorale.

Pour évaluer le potentiel clinique de l'ARN circulant, nous avons également analysé le niveau après néphrectomie. Une réduction significative de l'ARN circulant est observée une semaine après l'opération. Cette réduction significative indique que l'augmentation de l'ARN circulant peut provenir de la tumeur elle-même. Ce résultat prouve aussi que l'ARN circulant peut être utilisé pour le suivi post-opératoire.

La spectrophotométrie utilisée pour mesurer le niveau de l'ARN circulant est utilisée couramment dans les laboratoires et ouvre donc la voie à une utilisation pratique.

En conclusion, nous avons démontré le haut niveau de l'ARN circulant chez les patients atteints de CRCC. Les données suggèrent que l'ARN circulant peut être un outil de diagnostic pour discriminer les patients atteints de CRCC des témoins sains ou des patients atteints d'oncocytome rénal. L'ARN circulant utilisé comme biomarqueur sérique constitue un nouveau domaine de recherche pour le CRCC diagnostic.

2. Deuxième article.

Urology, 2010, 75, 262-265

Prediction of clear cell renal cell carcinoma by integrity of cell-free DNA in serum

Gang Feng^{1,2}, Guorong Li², An Zhao¹, Anne Gentil-Perret³, Christian Genin¹, Jacques Tostain²

1. Clinical Immunology Laboratory

2. Department of Urology

3. Department of Pathology, CHU of Saint-Etienne, Faculty of Medicine Jacques Lisfranc,
University JEAN-MONNET.



2.1 Introduction

L'ADN libéré par les tumeurs dans les liquides corporels est devenu un marqueur prometteur pour le développement de nouveaux tests cliniques. Bien qu'il ait été suggéré d'utiliser les ADN circulants en clinique, la complexité technique et le coût élevé limitent leur application pratique dans la détection du cancer. Par conséquent, un test simple et peu coûteux est souhaitable pour la détection du cancer.

L'ADN peut être libéré par les cellules apoptotiques ou les cellules nécrotiques. La taille de l'ADN peut être utilisée pour déterminer l'origine de l'ADN de ces cellules. La nécrose tumorale est un événement fréquent dans les tumeurs solides malignes, et ceci génère un spectre de fragments d'ADN de différentes longueurs en raison de la digestion aléatoire et incomplète de l'ADN génomique. En revanche, la mort cellulaire dans les tissus sains se fait essentiellement via l'apoptose qui libère dans la circulation des fragments d'ADN uniformément tronqués par un processus programmé de clivage enzymatique.

Nous émettons l'hypothèse que le CRCC peut décharger des fragments d'ADN de grande longueur dans la circulation. Parce que le gène GAPDH est commun à tous les génomes, nous avons conçu des amorces GAPDH de tailles différentes (tailles des produits: 109bp, 193bp, 397bp et 456bp) et les avons utilisés en PCR traditionnelle pour mesurer l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum. Nous avons tenté de déterminer si l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum pourrait servir d'outil efficace pour la détection de CRCC et si l'intervention chirurgicale pouvait modifier l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum.

Renal Cancer

Prediction of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Integrity of Cell-free DNA in Serum

Feng Gang, Li Guorong, Zhao An, Gentil-Perret Anne, Genin Christian, and Tostain Jacques

OBJECTIVES	To hypothesize that serum cell-free DNA integrity may be clinically useful for prediction of clear cell renal cell carcinoma (cRCC). The integrity of cell-free DNA released from cancer cells was different from that released from apoptotic cells.
METHODS	We collected peripheral blood samples from 78 patients before surgery; among these patients, 22 with tumor, both pre- and postoperation, and 42 controls without tumor. After the column extraction of DNA, we performed conventional polymerase chain reaction using different sizes of primers (size of products: 109, 193, 397, and 456 bp) of the housekeeping gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for measurement of serum cf-DNA integrity.
RESULTS	Age and gender were not associated with cf-DNA integrity in controls ($P = .136$ and $P = .345$). Among the cRCC patients, we observed no significant association between cf-DNA integrity and gender, age, tumor grade ($P = .510$, $P = .618$ and $P = .052$), except tumor stage and size ($P = .001$ and $P = .001$). All specimens contained 109 bp products. The 193 bp product was detected in 75 of 78 cRCCs and 37 of 42 controls ($P = .091$), 21 of 22 patients preoperation and 19 of 22 postoperation ($P = .294$). The 397 bp product was detected in 71 of 78 cRCCs and 0 of 42 of controls ($P = .001$), 18 of 22 patients preoperation- and 7 of 22 postoperation ($P = .003$). The 456 bp product was detected in 69 of 78 of cRCCs and 0 of 42 of controls ($P = .001$), 18 of 22 preoperation and 3 of 22 postoperation ($P = .002$).
CONCLUSIONS	Serum cf-DNA integrity may be a potential tool for the detection of clear cRCC. UROLOGY 75: 262–265, 2010. © 2010 Elsevier Inc.

It is well recognized that intracellular material such as DNA may be released into circulation, and cell-free DNA (cf-DNA) has been detected in serum, plasma, and other fluids.¹ High concentrations of cf-DNA in serum and plasma samples have been widely described in a variety of clinical pathologic conditions, such as malignancies, trauma, infections, pregnancy-associated disorders, and autoimmune diseases.^{2–5} The cf-DNA is released from tumors into bodily fluids which has become a promising biomarker template for the development of new clinical assays.^{6,7} Recently, it was shown that levels of cf-DNA in serum and/or plasma were increased in patients with testicular, colorectal, and ovarian cancer.^{8–10} Furthermore, many genetic and epigenetic alterations such as allelic loss, microsatellite instability, point mutations, amplification, translocation, and gene promoter region hypermethylation are associated with the development of tumor. The absolute concentration of

cf-DNA, genetic and epigenetic alterations of cf-DNA could also be detected in serum and/or plasma and other bodily fluids.^{11–14} Although these aberrations of cf-DNA have been suggested to have clinical use, the technical complexity and high cost challenged their practical application in cancer detection. Therefore, a simple and inexpensive assay is desirable for cancer detection.

DNA could be released from apoptotic or necrotic cells, and DNA size distribution may be used to determine the origin of DNA from either apoptotic or necrotic cells. Tumor necrosis is a frequent event in solid malignant neoplasms, and it generates a spectrum of DNA fragments with different strand lengths because of random and incomplete digestion of genomic DNA by a variety of deoxyribonucleases. In contrast, cell death in normal tissues is mainly through apoptosis that release DNA fragments into circulation and this uniformly truncated DNA is produced by a programmed enzymatic cleavage process.^{15,16} Support for this hypothesis has been found in recent studies demonstrating increased DNA length in serum and/or plasma from patients with head and neck cancer, and colorectal or periampullary cancer.^{17,18}

We hypothesize that the tumor of clear cell renal cell carcinoma (cRCC) may discharge high length DNA fragments into the circulation. Because the glycerol-

This research was supported by the Comité de la Loire de la Ligue Contre le Cancer.

Feng Gang and Li Guorong have equally contributed to this work.

From the Department of Urology, Clinical Immunology Laboratory, and Department of Pathology, CHU of St-Etienne, University Jean-Monnet, St-Etienne, France

Reprint requests: Feng Gang, M.D., Clinical Immunology Laboratory, CHU of St-Etienne, 42055 St-Etienne Cedex 2, France. E-mail: fenggang0225@yahoo.fr

Submitted: April 29, 2009, accepted (with revisions): June 21, 2009

dehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene is common to all genomes, we designed different sizes of GAPDH primers (size of products: 109, 193, 397, and 456 bp) and used conventional polymerase chain reaction (PCR) for the measurement of cf-DNA integrity. We attempted to determine whether serum cf-DNA integrity could serve as an effective tool for the detection of cRCC and whether surgery of cRCC could alter serum cf-DNA integrity of patient.

MATERIAL AND METHODS

Patients

A total of 78 patients with cRCC were recruited from the Department of Urology, CHU of Saint Étienne, France. All patients with cRCC had the pathologic diagnosis, which was based on the Fuhrman grade and UICC system.^{19,20} Of 78 subjects, 42 without tumor were used as controls. There was no statistical difference in age between the patients with cRCC and controls.

Samples Collection

We collected peripheral blood samples from 78 patients before surgery. Among these patients, we collected 22 patients with tumor, both pre- and postoperation (after 7 days) and 42 controls. A total of 3.5 mL of blood was collected in a serum separator tube (BD, Plymouth, UK) and processed within 2 hours. Serum was separated by centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes at 4°C and frozen immediately at -80°C until DNA extraction.

Extraction and Measurement of DNA

Before DNA extraction, serum was centrifugated again at 3000 rpm for 10 minutes at 4°C. DNA was extracted from serum using QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocols. For each patient, 400 µL of the stored serum was used for extraction of DNA. The DNA was quantified using UV spectrophotometry at 260 nm and stored immediately at -20°C until PCR.

DNA Integrity Analysis

The cf-DNA integrity was measured by the conventional PCR method. We used Oligo Primer Analysis Software, version 6.0 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO) to design different sizes of GAPDH primers (Table 1). Conventional PCR was performed in 25-µL reaction mixture containing 2 µL of DNA, 100 nM of both sense and antisense primers, and 10 µL MasterMix (5 PRIME, Hamburg). The PCR conditions were denaturated for 2 minutes at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 60 seconds, annealing at 57°C for 60 seconds, extension at 72°C for 60 seconds, and final extension step at 72°C for 5 minutes. PCR products were separated by 2% agarose gel, and fragments were visualized with ethidium bromide staining.

Statistical Methods

Statistical analysis was based on the SPSS v16 software package (SPSS Inc, Chicago, IL). Pearson χ^2 test was used to compare cf-DNA integrity of 2 or more groups and explore the relationship with gender, age, tumor stage, grade, and size, before and after surgery. The value of $P < .05$ was judged as significant.

Table 1. Sequences and fragments of GAPDH primers

	Sequences	Fragment (bp)
GAPDH-1		
Forward	AAAGGACATTTCCACCGCAAA	109
Reverse	GGTCGGGTCAACGCTAGGCT	
GAPDH-2		
Forward	CCCATCCCTTCTCCCCACAC	193
Reverse	CAAGCCCACCCCTTTCTAAG	
GAPDH-3		
Forward	TAGAGAAGGGGTGGGCTTGC	397
Reverse	CCCTAGGCCACCTCCCCATTA	
GAPDH-4		
Forward	GGCTTGCCCTGTCCAGTTAAT	456
Reverse	CGCCCAATACGACCAAT	

RESULTS

The median age was 63 years for cRCC patients (range 35-86) and 62 years for controls (range 42-80). Table 2 summarizes cf-DNA integrity in different groups. Age and gender were not associated with cf-DNA integrity in controls ($P = .136$ and $P = .345$). Among the cRCC patients, we observed no significant association between cf-DNA integrity and gender, age, tumor grade ($P = .510$, $P = .618$, and $P = .052$), except tumor stage and size ($P = .001$ and $P = .001$).

All the specimens contained 109 bp products. The 193 bp product was detected in 75 of 78 of cRCCs and 37 of 42 of controls ($P = .091$). The 397 bp product was detected in 71 of 78 of cRCCs and 0 of 42 of controls ($P = .001$). Furthermore, the 456 bp product was detected in 69 of 78 of cRCCs and 0 of 42 of controls ($P = .001$). Figure 1 shows cf-DNA integrity in cRCC patients pre- and postoperation. The 109 bp product was detected in all 44 specimens, the 193 bp product was detected in 21 of 22 before surgery and 19 of 22 after surgery ($P = .294$). The 397 bp product was detected in 18 of 22 pre- and 7 of 22 postoperation ($P = .003$). Furthermore, the 456 bp product was detected in 18 of 22 preoperation and in 3 of 22 postoperation ($P = .002$).

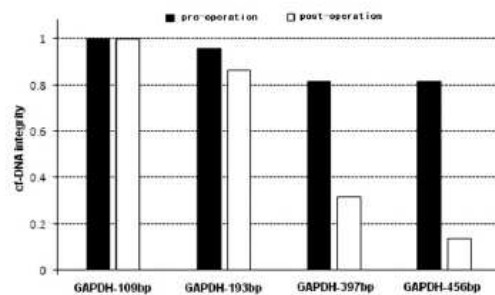
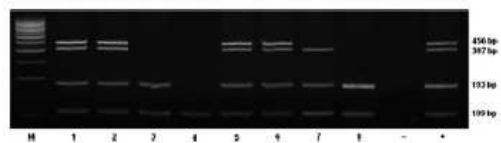
Figure 2 demonstrates the example bands in different groups.

COMMENT

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for 85% of all malignant tumors of the kidney and is the seventh leading malignancy among men and the 12th among women.²¹ RCC is a clinicopathologically heterogeneous disease, conventionally subdivided into clear cell, granular cell, papillary, chromophobe, spindle cell, cystic, and collecting duct carcinoma subtypes based on morphologic features according to the WHO International Histological Classification of Kidney Tumors. Clear cell RCC is the most common adult renal neoplasm, representing 70%-80% of all renal neoplasms.²² Currently, however, most renal cancers are diagnosed by serendipity or in the

Table 2. cf-DNA integrity in different groups

No. Cases	DNA Integrity						
	109 bp	193 bp	P	397 bp	P	456 bp	P
cRCC patients (N = 78)							
Gender			.962		.725		.510
Male	51	49		46		46	
Female	27	26		25		23	
Age			.360		.348		.618
≤ 50	11	10		9		9	
51-69	40	38		36		35	
≥ 70	27	27		26		25	
TNM			.063		.004		.001
T1 + T2	37	34		30		28	
T3	41	41		41		41	
Fuhrman Grade			.141		.132		.052
G1 + G2	46	43		40		38	
G3 + G4	32	32		31		31	
Tumor size			.133		.007		.001
≤ 4.0 cm	34	31		27		25	
4.1-7.9 cm	22	22		22		22	
≥ 8.0 cm	22	22		22		22	
Controls without tumor (N = 42)							
Gender			.136				
Male	35	32		0		0	
Female	7	5		0		0	
Age			.345				
≤ 50	3	2		0		0	
51-69	33	29		0		0	
≥ 70	6	6		0		0	

**Figure 1.** Serum cf-DNA integrity of pre- and postoperation patients with cRCC.**Figure 2.** A gel view of 4 size PCR products from serum of different groups. Lane M is for the molecular marker. Lane 1 and 2 are for cRCC patients. Lane 3 and 4 are for controls without tumor. Lane 5 and 6 are for cRCC preoperation patients. Lane 7 and 8 are for cRCC postoperation patients. Lane - and + are for negative and positive control.

presence of vague signs or symptoms.²³ Therefore, there is an apparent need to find a tool for the detection of RCC.

Diagnostic assays based on blood sample analysis are attractive because of the simplicity of sample collection. Different methods such as microsatellite analysis, restriction enzyme-mediated enrichment assay, and digital single-nucleotide polymorphism analysis had identified DNA alterations in circulating serum and/or plasma DNA from cancer patients that match with genetic changes present in primary tumors.¹¹⁻¹⁴ These analyses of serum and/or plasma DNA may be used for early diagnosis and other detection strategies. However, the technical complexity and high cost make these approaches challenging for immediate clinical applications.

In the present study, we compared DNA integrity in the pre- and postoperation serum of patients with cRCC and controls without tumor using conventional PCR. We detected 109, 193, 397, and 456 bp GAPDH fragments of serum cf-DNA in patients with cRCC. In contrast, we only detected 109 and 193 bp GAPDH fragments in controls. These data are consistent with the study of plasma cf-DNA length measurement in healthy controls (185-200 bp). Our results indicated that DNA integrity is elevated in the serum of patients with cRCC as compared with controls. Among the cRCC patients, we observed no significant difference of cf-DNA integrity in groups with different gender, age, and tumor grade. Furthermore, serum cf-DNA integrity was significantly elevated in cRCC patients with high-stage (TNM 3) and large tumor size (> 4.0 cm). These findings could be explained by the fact that necrosis was a more frequent event in patients with tumor than in normal subjects and associated with

stage and size of tumor. As a consequence, serum cf-DNA in tumor patients has a wide range of DNA fragment lengths by random and incomplete digestion of genomic DNA.

Percentages of 397 and 456 bp of cf-DNA detected in patients before surgery were higher than in patients after surgery. Serum cf-DNA integrity for cRCC patients measured postoperatively showed a significant difference when compared with preoperation samples. One possible consideration is that surgery removed renal tumor and reduced serum cf-DNA from tumor necrosis. We found that long fragments were detected in serum of postsurgical patients. On the basis of the fact that cf-DNA from dead and dying cells could also appear in the blood, we hypothesize that cf-DNA of postsurgical patients may be a result of persistent inflammation associated with postoperative healing.

The assay of serum cf-DNA integrity as less-invasive techniques in the renal cancer patients is of great interest. Conventional PCR is a simple, rapid, and inexpensive method that could measure the integrity of serum cf-DNA. We could use this method widely to detect cRCC in people with high risks of kidney cancer. However, there are some limitations in our study. First, we did not study other types of cancers as controls. We do not think this assay is specific to kidney cancers. Second, we did not perform the power calculation or methods of matching cases and controls before analysis. The difference of cf-DNA integrity in groups with different gender, age, and tumor grade might not be detected because of the relatively small sample sizes. Third, in our study, postoperation serum samples were only collected 7 days after surgical resection. It would be interesting to see if there are any changes beyond 1 month of surgery.

CONCLUSIONS

Our results indicated that serum cf-DNA integrity in patients with cRCC was significantly increased as compared with that in controls without tumor. In addition, the postoperation serum of cRCC patients demonstrated a significant difference in the DNA integrity when compared with that of the preoperation sample. Thus, serum cf-DNA integrity may be a potential tool for the detection and diagnosis of cRCC.

References

1. Chan AK, Chiu RW, Lo YM. Clinical Sciences Reviews Committee of the Association of Clinical Biochemists. Cell-free nucleic acids in plasma, serum, and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Ann Clin Biochem.* 2003;40:122-130.
2. Boddy JL, Gal S, Malone PR, et al. Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1394-1399.
3. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, et al. Circulating deoxyribonucleic acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2004;22:4157-4164.
4. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61:1659-1665.
5. Goebel G, Zitt M, Müller HM. Circulating nucleic acids in plasma or serum (CNAPS) as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias. *Dis Markers.* 2005;21:105-120.
6. Lam NY, Rainer TH, Chan LY, et al. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin Chem.* 2003;49:1286-1291.
7. Leung TN, Zhang J, Lau TK, et al. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem.* 2001;47:137-139.
8. Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, et al. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J Urol.* 2009;181:363-371.
9. Schwarzenbach H, Stoecklacher J, Pantel K, et al. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1137:190-196.
10. Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, et al. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol.* 2008;112:843-850.
11. Utting M, Werner W, Dahse R, et al. Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8:35-40.
12. Widschwendter A, Müller HM, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10:565-571.
13. Gocke CD, Benko FA, Kopreski MS, et al. P53 and APC mutations are detectable in the plasma and serum of patients with colorectal cancer (CRC) or adenomas. *Ann NY Acad Sci.* 2000;906:44-50.
14. Chang HW, Lee SM, Goodman SN, et al. Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance, and CA125 as diagnostic tests for cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1697-1703.
15. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2005;4:139-163.
16. Giacomini MB, Ruben GC, Iczkowski KA, et al. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas.* 1998;17:89-97.
17. Jiang WW, Zahurak M, Goldenberg D, et al. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *Int J Cancer.* 2006;119:2673-2676.
18. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, et al. Increased integrity of free circulating DNA in Sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem.* 2006;52:1062-1069.
19. Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer, UICC. In: *TNM Classification of Malignant Tumors*, 6th ed. New York: Wiley; 2002.
20. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C, et al. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982;6:655-663.
21. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2005;353:2477-2790.
22. Mostofi FK, Davis CJ. *WHO International Histological Classification of Tumors*. Berlin: Springer; 1998.
23. Siow WY, Yip SK, Tan PH, et al. Renal cell carcinoma: incidental detection and pathological staging. *J R Coll Surg Edinb.* 2000;45:291-295.

2.2 Discussion

Dans cette étude, nous avons comparé l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum de patients atteints de CRCC et des témoins sains par PCR traditionnelle avant et après l'opération. Nous avons détecté des fragments de GAPDH de 109 bp, 193 bp, 397 bp, et 456 bp de l'ADN circulant chez des patients atteints de CRCC. En revanche, nous avons détecté seulement des fragments de GAPDH de 109 bp et 193 bp chez les témoins sains. Nos résultats démontrent que l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum de patients atteint de CRCC est plus élevée que chez les témoins sains. En outre, l'intégrité de l'ADN circulant était significativement élevée chez les patients avec CRCC de stade élevé (T3) et avec une tumeur de grande dimension (>4,0 cm). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la nécrose est aussi associée au stade et à la taille de la tumeur.

L'intégrité de l'ADN circulant des sérums des patients atteints de CRCC avant opération présente une différence significative en comparaison avec les sérums post-opératoires. Une possibilité est que la chirurgie a réduit l'ADN circulant provenant de la nécrose tumorale.

L'étude de l'intégrité de l'ADN circulant est le test le moins invasif pour les patients atteints de CRCC. La PCR conventionnelle est une méthode simple, rapide et peu coûteuse qui peut mesurer l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum. Une utilisation pratique est envisageable pour détecter les CRCC chez les personnes présentant un risque élevé de cancer du rein et pour assurer le suivi post-opératoire.

3. Troisième article

Journal of Urology, 2008, 180, 510-514

Serum Carbonic Anhydrase 9 Level is Associated With Postoperative Recurrence of Conventional Renal Cell Cancer

Guorong Li², Gang Feng^{1,2}, Anne Gentil-Perret³, Christian Genin¹, Jacques Tostain²

1. Clinical Immunology Laboratory

2. Department of Urology

3. Department of Pathology, CHU of Saint-Etienne, Faculty of Medicine Jacques Lisfranc,
University JEAN-MONNET.



3.1 Introduction

CA9 est considéré comme un marqueur prometteur du diagnostic et du pronostic moléculaire chez les patients présentant un CRCC. Bien que la forme soluble de la protéine CA9 ait été trouvée dans le sérum, aucun rapport concernant l'utilité clinique de la protéine CA9 dans le sérum chez les patients avec cancer n'a été publié. Nous avons examiné le niveau de la protéine CA9 dans le sérum chez les patients porteurs d'un CRCC.

Serum Carbonic Anhydrase 9 Level is Associated With Postoperative Recurrence of Conventional Renal Cell Cancer

Guorong Li,^{*,†,‡} Gang Feng,^{†,§} Anne Gentil-Perret, Christian Genin and Jacques Tostain

From the Department of Urology (GL, JT) and Clinical Immunology Laboratory (GF, CG), and Department of Pathology (AGP), North Hospital, CHU of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

Purpose: We explored the clinical usefulness of serum carbonic anhydrase 9 as a potential biomarker for conventional renal cell cancer.

Materials and Methods: This study included 91 patients with conventional renal cell cancer and 32 healthy individuals. Enzyme linked immunosorbent assay was used to measure the carbonic anhydrase 9 level. A followup (median 38 months) was performed to track early recurrence after surgery for patients with localized disease. Recurrence-free survival curves were calculated by the Kaplan-Meier method and compared using the log rank test.

Results: The mean serum carbonic anhydrase 9 level in patients with metastatic conventional renal cell cancer (216.68 ± 67.02 pg/ml) or localized conventional renal cell cancer (91.65 ± 13.29 pg/ml) was significantly higher than in healthy individuals (14.59 ± 6.22 pg/ml, $p < 0.001$ and $p = 0.001$, respectively). The mean serum carbonic anhydrase 9 level in patients with metastatic conventional renal cell cancer was significantly higher than in those with localized disease ($p = 0.004$). Of patients with localized disease those with recurrence had a significantly higher serum carbonic anhydrase 9 than those without recurrence ($p = 0.001$). On univariate analysis serum carbonic anhydrase 9, tumor stage, tumor grade and tumor size were associated with recurrence. The recurrence-free survival curve indicates that patients with a high serum carbonic anhydrase 9 level had a significantly higher recurrence rate than those with a low serum carbonic anhydrase 9 ($p = 0.001$).

Conclusions: Our data suggest that serum carbonic anhydrase 9 is increased as the tumor progression occurs. A high carbonic anhydrase 9 level is associated with postoperative recurrence.

Key Words: biological markers; CA9 protein, human; enzyme-linked immunosorbent assay; prognosis; carcinoma, renal cell

The extensive use of ultrasound and computerized tomography has been successful in detecting renal tumors and as a result many renal tumors without symptoms have been found. However, nearly 30% of patients present with metastatic disease at diagnosis and 30% to 40% of patients with clinically localized CRCC will have recurrence after surgery.¹ Imaging examinations are expensive to monitor renal cancer. There is an apparent need to find serum markers to improve diagnosis and monitor renal cancers after operation. Unfortunately there has been no serum marker available.

CA9 is an oncogene.² This gene encodes the oncoprotein alternatively named the membrane antigen MN, MN/CA9, CA9 or the G250 protein. CA9 is a member of the carbonic anhydrase family. The CA9 protein consists of an N-terminal signal peptide, an extracellular proteoglycan related domain and catalytic domain, a transmembrane segment, and

a C-terminal intracellular tail. Its principal function is to regulate pH by catalyzing the reversible hydration of carbon dioxide to carbonic acid. CA9 is expressed in many cancer types including uterine, cervical, ovarian, endometrial, bladder, breast, colorectal, lung, esophageal, head and neck, prostate and conventional renal cell.^{3,4} The major mechanism underlying the over expression in tumor samples is hypoxia. Under hypoxic conditions the CA9 gene is induced by its upstream regulator, hypoxia inducing factor-1. Another mechanism for over expression is the loss of the tumor suppressor gene, von Hippel-Lindau. CA9 has also been studied as a prognostic marker in many cancers. However, these studies using immunohistochemistry or RT-PCR are limited in surgical tumor samples.

CA9 is regarded as one of the most promising diagnostic and prognostic molecular markers in CRCC.⁵⁻⁹ Although the soluble form of CA9 was found in serum, no report to our knowledge has been published regarding the clinical usefulness of serum CA9 in patients with cancer.¹⁰ It would be of interest to examine serum CA9 level in patients with CRCC and, thus, we explored potential role of serum CA9 as a biomarker for CRCC.

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects

A total of 91 patients with CRCC were entered in this study. The study was approved by the local ethics committee. The patients received the necessary information concerning the

Submitted for publication January 10, 2008.

Study received local ethics committee approval.

* Correspondence: Department of Urology, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 2, France (telephone: 0033477828814; FAX: 0033477120552; e-mail: grli2001@yahoo.fr).

† Equal study contribution.

‡ Supported by the INCa Cancéropôle CLARA and by the project PHRC of the French Ministry of Health.

§ Supported by the Ligue Contre le Cancer du Comité de la Loire.

See Editorial on page 433.

For other articles on a related topic see pages 724 and 729.

study and consent was asked from each patient. All patients with a renal tumor had a pathological diagnosis. CRCC was graded and staged according to the UICC system.^{11,12} At diagnosis 12 patients were found to have a metastasis and 32 healthy individuals were used as controls. Clinical data are summarized in table 1. There was no statistical difference in age between patients with CRCC and healthy individuals. Median followup for the patients with nonmetastatic disease was 38 months (range 4 to 99).

Collection of Serum Samples

Blood samples (5 ml) were collected before surgery and processed within 5 hours. The blood tube was centrifuged at 1,200 g for 10 minutes at 4°C followed by careful separation of serum. The serum was stored at -80°C before use.

Serum CA9 Immunoassay

ELISA kits for specific CA9 were used according to manufacturer protocol (Quantikine Human CA9 Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). Serum samples (100 µl) and standard or control samples were incubated on microtiter plates coated with a specific monoclonal antibody for 2 hours at room temperature. The plates were washed to remove unbound antibody. After incubation of a conjugate solution a substrate solution was added. Color development was stopped after 30 minutes. A microplate reader was used to determine colorimetric densities at 450 nm. Final results were calculated according to the standard curve and results were expressed in pg/ml.

Statistical Analysis

Statistical analysis was based on SPSS® v13 software package. We used the Mann-Whitney and nonparametric Kruskal-Wallis tests to compare serum CA9 levels of 2 or more groups, and to explore the relationship of CA9 levels with sex, age, tumor stage, tumor grade or tumor size, respectively. Optimal sensitivity and specificity of serum CA9 were determined by ROC curve analysis. Recurrence-free survival curves were calculated by the Kaplan-Meier method and compared using the log rank test. Recurrence-free survival was defined as no metastasis or death caused by the disease during followup visits. Relationships between the cumulative probability of early recurrence and clinical variables, including serum CA9 level, were determined by

Pts with CRCC		
No. sex (%):		
Male	61	(67.0)
Female	30	(33.0)
Median age (range)	65	(35–86)
No. TNM (%):		
T1	39	(42.9)
T2	6	(6.6)
T3	46	(50.5)
No. grade (%):		
G1	14	(15.4)
G2	42	(46.2)
G3	28	(30.8)
G4	7	(7.7)
Healthy pts		
No. sex (%):		
Male	27	(84.4)
Female	5	(15.6)
Median age (range)	59	(49–65)

	No. Pts	Mean \pm SD CA9 (pg/ml)	p Value
Age:			0.529
50 or Younger	11	186.18 \pm 128.83	
51–69	45	107.80 \pm 22.31	
70 or Older	35	99.47 \pm 16.42	
Sex:			0.557
Male	61	120.11 \pm 27.42	
Female	30	101.81 \pm 22.47	
Stage:			0.010
T1 + T2	45	76.52 \pm 18.87	
T3	46	150.82 \pm 33.82	
Grade:			0.012
1 + 2	56	83.19 \pm 16.60	
3 + 4	35	163.52 \pm 43.10	
Tumor size (cm):			0.002
Less than 4	27	52.81 \pm 10.40	
4–7	38	80.41 \pm 14.31	
Greater than 7	26	226.90 \pm 60.24	
Metastasis:			0.004
No	79	91.65 \pm 13.29	
Yes	12	216.68 \pm 67.02	
Recurrence:			0.001
No	67	77.95 \pm 14.34	
Yes	12	168.15 \pm 27.23	
Healthy	32	14.59 \pm 6.22	
Sex:			0.579
Male	27	14.12 \pm 2.78	
Female	5	17.18 \pm 5.85	

Cox regression univariate analyses with $p < 0.05$ considered significant.

RESULTS

The characteristics of the study population are summarized in table 1. Median age was 65 years for patients with CRCC and 59 for healthy individuals. Table 2 summarizes serum CA9 levels. Age and sex did not correlate with serum CA9 amounts. In patients with CRCC a significant association was observed between serum CA9 and stage, tumor grade or tumor size.

Figure 1 shows the mean values of serum CA9 in patients with metastatic CRCC, localized CRCC and healthy individuals. The mean value of serum CA9 in patients with

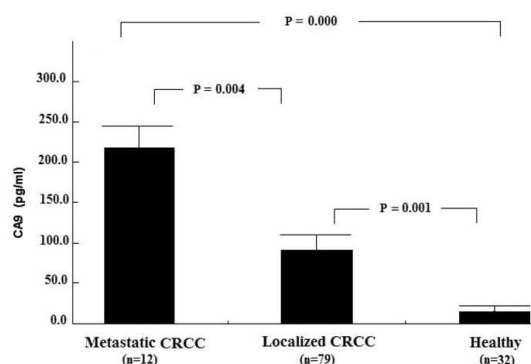


FIG. 1. Mean values of metastatic CRCC, localized CRCC and healthy cases. There is significant difference in mean values among groups of metastatic CRCC, localized CRCC and healthy individuals.

metastatic CRCC (216.68 ± 67.02 pg/ml) was significantly higher than in those with localized CRCC (91.65 ± 13.29 pg/ml, $p = 0.004$) or in healthy individuals (14.59 ± 6.22 pg/ml, $p < 0.001$). The mean value was significantly higher in patients with localized CRCC than in healthy individuals ($p = 0.001$). Serum CA9 had a sensitivity of 76.9% and a specificity of 68.9% using the optimal cutoff point by ROC curve analysis. The area under the ROC curve was 0.776 (95% CI 0.693 to 0.860). Based on this cutoff we obtained a positive predictive value of 87.5% and a negative predictive value of 51.2%. During followup 12 patients with localized CRCC had disease recurrence and these patients had a significantly higher serum CA9 than those without recurrence ($p = 0.001$). Figure 2 shows a recurrence-free survival curve calculated by the Kaplan-Meier method with the median CA9 level used as a cutoff. Those cases above the median level were determined to have a high CA9 and those below the median level a low CA9. The recurrence-free survival curve indicates that the patients with a high serum CA9 had a significantly higher recurrence rate than those with a low serum CA9 ($p = 0.001$). By univariate analysis table 3 shows that serum CA9, grade, stage and tumor size were the factors correlated with recurrence.

DISCUSSION

A number of cellular proteins have been shown to be increased in the sera of patients with cancer. Intracellular proteins can be released by dying cells and detected in body fluids. Body fluids such as serum or plasma serve as a storehouse for tumor related proteins. These traditional serum tumor markers include carcinoembryonic antigen, cancer antigen 125 (CA 125), carbohydrate antigen 19-9 (CA-19), etc.¹³ There is no serum marker for CRCC. Our data indicate that serum CA9 is increased in the majority of patients with CRCC. We found that serum CA9 level was related to tumor size, stage and grade. Patients with metastatic CRCC had a significantly higher serum CA9 than

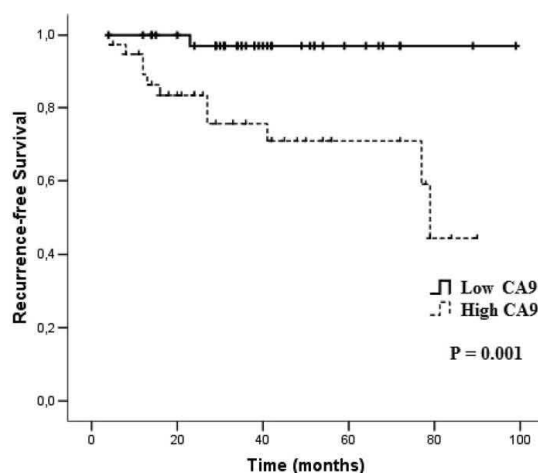


FIG. 2. Recurrence-free survival curve. Patients who had high serum CA9 have significantly higher rate of recurrence compared with those who had low serum CA9 value. Y-axis shows recurrence-free survival rate.

TABLE 3. Cox regression univariate analysis of variables and early recurrence

Prognostic Variables	HR	95% CI		p Value
		Lower	Upper	
Age (50 or younger/51-69/70 or older)	0.987	0.938	1.038	0.612
Sex (male/female)	1.029	0.309	3.428	0.962
CA9	11.836	1.515	92.459	0.018
Grade (G1+G2/G3+G4)	2.271	1.083	4.763	0.030
Stage (T1+T2/T3)	1.185	1.010	1.390	0.037
Tumor size (less than 4/4-7/greater than 7 cm)	4.186	1.130	15.510	0.032

those with localized disease and those with localized disease had a significantly higher serum CA9 than healthy individuals. Our data seem to suggest that serum CA9 had an acceptable sensitivity and specificity. CA9 can have a key role in the modulation of cell adhesion processes and participates in the regulation of cell proliferation in response to a hypoxic environment to ultimately contribute to tumor progression.¹⁴ Thus, it can be seen that increased serum CA9 levels in patients with CRCC naturally correspond with tumor progression. Large scale studies are needed to evaluate the diagnostic value in patients with CRCC.

One of the difficulties in the postoperative management of CRCC is the prediction of early recurrence. RCC presents as localized disease in approximately 70% of patients. For these patients the goal of surgery is for cure. Unfortunately up to 40% of all patients will present with recurrent disease after surgery. Metastasis is a major cause of death for patients with CRCC. Most recurrences appear in the first 3 to 5 years after radical nephrectomy.¹⁵ Because of the high percentage of recurrent disease there is a need to identify these patients with conventional and molecular risk factors. Therefore, in our analysis we emphasized the prediction of early recurrence. The recurrence-free curve clearly indicates the difference between the high and low serum CA9 groups. High serum CA9 was characterized by a high incidence of recurrence. By univariate analysis pathological stage, grade, tumor size and serum CA9 are the significant factors of early postoperative CRCC recurrence. Serum CA9 could enable the identification of a subpopulation characterized with a higher risk of recurrence. These patients might benefit from adjuvant treatment immediately after surgery. Thus, serum CA9 may be a new molecular tool to guide postoperative followup and treatment. CA9 has largely been studied in tumor tissues as a prognostic marker and as a response marker to therapy in many cancer types. To our knowledge this is the first report to provide evidence that serum CA9 is useful for prognosis in cancer. In addition, we believe that serum CA9 should also be tested as a marker for monitoring response to CRCC therapy.¹⁶

Our study shows that CA9 is easily detectable in the serum of patients with cancer with improvements in an appropriate method such as ELISA. Some studies suggest an independent prognostic value of CA9 expression in tumor tissues for CRCC.^{6,8,17} A recent study demonstrated that CA9 expression in tumor tissues is not an independent predictor of outcome for patients with CRCC.¹⁸ When tumor tissues are used we must consider the heterogeneity of tumor tissue and difficulty in standardization of assay techniques such as immunochemistry or RT-PCR. The ELISA is

a clinical and well established routine analysis, and serum samples are easily managed. Therefore, serum analysis has advantages compared to tumor tissue analysis.

CONCLUSIONS

We believe that serum CA9 is increased in the majority of patients with CRCC. High serum CA9 levels are associated with postoperative recurrence. Serum CA9 may be a valuable diagnostic and prognostic tool in CRCC, and larger studies are worthwhile to confirm our observations.

ACKNOWLEDGMENTS

D. Laurent provided technical assistance.

Abbreviations and Acronyms

CA9	=	carbonic anhydrase 9
CRCC	=	conventional renal cell cancer
ELISA	=	enzyme linked immunosorbent assay
PSA	=	prostate specific antigen
RCC	=	renal cell carcinoma
RT-PCR	=	reverse transcriptase-polymerase chain reaction

REFERENCES

- Lam JS, Leppert JT, Figlin RA and Beldegrum AS: Role of molecular markers in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma. *Urology* 2005; **66**: 1.
- Pastorek J, Pastorekova S, Callbaut I, Mornon JP, Zelnik V, Opavsky R et al: Cloning and characterisation of MN, a human tumour-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and putative helix-loop-helix-DNA binding segment. *Oncogene* 1994; **9**: 2877.
- Li G, Feng G, Achour Y, Genin C and Tostain J: MN/CA9 as a novel molecular marker for the detection of cancer. *Exp Opin Med Diag* 2007; **1**: 91.
- Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G et al: Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001; **158**: 905.
- Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J and Stanbridge EJ: Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 1997; **57**: 2827.
- Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FG, Huang Y et al: Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 802.
- Li G, Cuilleron M, Gentil-Perret A, Cottier M, Passetbosc-Faure K, Lambert C et al: Rapid and sensitive detection of messenger RNA expression for molecular differential diagnosis of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 6441.
- Li G, Feng G, Gentil-Perret A, Genin C and Tostain J: CA9 gene expression in conventional renal cell carcinoma: a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *Clin Exp Metastasis* 2007; **24**: 149.
- Li G, Cuilleron M, Cottier M, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C et al: The use of MN/CA9 gene expression in identifying malignant solid renal tumors. *Eur Urol* 2006; **49**: 401.
- Zavada J, Zavadova Z, Zat'ovicova M, Hyrsi L and Kawaciuk I: Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum

and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer* 2003; **89**: 1067.

- Sobin LH and Wittekind C: TNM classification of malignant tumors, 6th edition. UICC International Union Against Cancer. New York: Wiley-Liss. 2003; p 193.
- Fuhrman SA, Lasky LC and Limas C: Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; **6**: 655.
- Margel D, Tal R and Baniel J: Serum tumor markers may predict overall and disease specific survival in patients with clinically organ confined invasive bladder cancer. *J Urol* 2007; **178**: 2297.
- Dorai T, Sawczuk IS, Pastorek J, Wiernik PH and Dutcher JP: The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. *Eur J Cancer* 2005; **41**: 2935.
- Skolarikos A, Alivizatos G, Laguma P and de la Rosette J: A review on follow-up strategies for renal cell carcinoma after nephrectomy. *Eur Urol* 2007; **51**: 1490.
- Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge E, Youmans A et al: Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 3714.
- Bui MH, Visapaa H, Seligson D, Kim H, Han KR, Huang Y et al: Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol* 2004; **171**: 2461.
- Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Cheville JC, Zavada J et al: Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 4757.

EDITORIAL COMMENT

The field of renal cell carcinoma is being revolutionized due in large part to a better understanding of the genetic basis of the disease. Based on the molecular characterization of clear cell RCC new therapeutic agents have been approved to target specific aberrant pathways. While these complex pathways have been exploited for drug development and targeted treatment, little progress has been made thus far in the development of a RCC specific serum biomarker. Thus, RCC lacks an important tool common to other urological malignancies such as prostate and testicular cancers that permits an assay based means to diagnose, quantify and/or monitor the state of the disease.

The discovery of CA9 in clear cell RCC has provided the field with one of the most exciting biomarkers in solid tumor oncology. In nonrenal, solid malignancies the hypoxic activation of hypoxia inducible factor-1 α leads to a host of cellular changes to allow growth in a hypoxic environment and results in focal CA9 expression.¹ In clear cell RCC, despite the absence of hypoxia, diffuse membrane CA9 expression can be found in more than 90% of patients as a result of *vhl* alteration (mutation or hypermethylation) (reference 6 in article).² Zavada et al first described the detection of a soluble form of CA9 in the serum and urine of patients with clear cell RCC (reference 10 in article). This soluble component appears to be a truncated form of the protein representing only the extracellular domain. In the current report Li et al used an ELISA for the detection of the soluble form of CA9. In this pilot study the authors have attempted to determine the usefulness of serum CA9 testing for clinical management. Patients with localized and metastatic clear cell RCC frequently demonstrated increased levels of serum CA9 compared to normal controls. Additionally, serum levels correlated with more aggressive localized disease as lev-

els increased with higher tumor grade, stage and tumor size. Li et al demonstrated an increased frequency of recurrence for those patients with localized disease demonstrating higher levels of serum CA9, which was statistically significant when controlling for stage, grade and size.

A reliable serum assay in RCC would have major implications for tumor screening particularly in high risk populations, in the selection of patients for adjuvant therapy, in surveillance and prognosis, and possibly as a surrogate marker for response to therapy. Clearly years of future investigations will be needed for a RCC serum marker to achieve the clinical impact of PSA in prostate cancer. For example, in the future testing for serum levels of CA9 in the post-nephrectomy setting will be required to assess if a detectable postoperative increase in fact represents subclinical micrometastatic disease, if a positive test confers an increased risk of clinical disease recurrence and if prompt treatment based on earlier detection of recurrence leads to an improvement in patient survival. However, the current study by Li et al represents the first preliminary step in the direction of using CA9 as a possible PSA for RCC.

Brian Shuch and Allan J. Pantuck

Department of Urology
David Geffen School of Medicine
University of California, Los Angeles
Los Angeles, California

1. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M et al: Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; **394**: 485.
2. Armstrong AJ, Garrett-Mayer E, Ou Yang YC, Carducci MA, Tannock I, de Wit R et al: Prostate-specific antigen and pain surrogacy analysis in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 3965.

REPLY BY AUTHORS

A blood based assay is highly desirable in the management of RCC. We are interested in exploring the clinical usefulness of CA9 in renal cancer. We first tried to use the RT-PCR of CA9 in fine needle aspiration as a molecular test for identifying the malignant tumors among the image indeterminate solid renal tumors (reference 9 in article). We realize that a blood based assay is more convenient than a pathological analysis. Renal cancer is characterized by abundant vascularizations, and so many tumor derived DNAs, RNAs and proteins are discharged into circulation. In the meantime the assay technologies such as serum proteomics, nanotechnology and ELISA are rapidly developing. We are optimistic that a serum based assay for renal cancer, eg CA9, will be available in the future to achieve the beneficial impact as the PSA for prostate cancer.

3.2 Discussion

Nos données indiquent que la protéine CA9 dans le sérum est augmentée chez la majorité des patients atteints de CRCC. Le niveau de la protéine CA9 dans le sérum est corrélé à la taille de la tumeur, au stade et au grade. Le niveau de la protéine CA9 dans le sérum des patients présentant des métastases de CRCC est significativement plus élevé que chez les patients présentant une forme localisée et que chez les témoins sains. Nos données indiquent que la protéine CA9 dans le sérum a une sensibilité et une spécificité acceptables pour le diagnostic de CRCC.

Environ 70% des patients atteints de CRCC sont des CRCC localisés et jusqu'à 40% de ces patients présenteront une récurrence après chirurgie. La métastase est une cause majeure de décès chez les patients atteints de CRCC. La plupart des récurrences apparaissent de 3 à 5 années après la néphrectomie radicale. La courbe de survie indique clairement la différence entre le groupe présentant des taux élevés de la protéine CA9 et le groupe présentant des taux bas. Le niveau haut de la protéine CA9 s'accompagne d'un taux élevé de récurrences de CRCC. Par l'analyse univariée de régression de Cox, le grade, la taille tumorale et la protéine CA9 sont des facteurs significatifs de récurrence postopératoire du CRCC. La protéine CA9 pourrait donc permettre l'identification d'une sous-population caractérisée par un risque plus élevé de récurrence, et constituer un nouvel outil moléculaire pour guider le suivi postopératoire et le traitement.

4. Article 1 en cours

CA9 mRNA is highly detectable in sera of patients with clear cell renal cell carcinoma: implication for molecular diagnosis

Guorong Li², Gang Feng^{1,2}, Anne Gentil-Perret³, Christian Genin¹, Jacques Tostain²

1. Clinical Immunology Laboratory

2. Department of Urology

3. Department of Pathology, CHU of Saint-Etienne, Faculty of Medicine Jacques Lisfranc, University JEAN-MONNET.

4.1 Introduction de l'article

Aujourd'hui la plupart des cancers rénaux sont diagnostiqués par hasard, ou en présence de signes ou de symptômes vagues. Par conséquent, des méthodes nouvelles sont nécessaires pour détecter de façon sensible et pour aider à un diagnostic précoce et améliorer la survie des patients avec CRCC [Siow WY et al. 2000].

La constatation que les tumeurs sont capables de libérer des acides nucléiques (ADN ou ARN) dans la circulation, a ouvert de nouveaux domaines pour le diagnostic et le pronostic de la tumeur [Boddy JL et al. 2005, Pathak AK et al. 2006, Vaupel P et al. 2001]. Comme il s'agit d'une tumeur solide, l'hypoxie représente une différence entre la tumeur RCC et les tissus normaux, ce qui est associé à l'agressivité tumorale du RCC, les métastases et les récides après traitement. Lors de la progression tumorale, CA 9 pourrait maintenir un pH normal dans les cellules tumorales malgré l'hypoxie, les tumeurs pouvant s'adapter à un microenvironnement hypoxique [Pantuck AJ et al. 2003]. Dans le CRCC, les mutations du gène VHL qui aboutit à une

perte ou une altération de la fonction de la protéine pVHL résulte en une quantité accrue d'HIF-1 α et ainsi à une augmentation du niveau des facteurs angiogéniques comme le CA9 [Grabmaier K et al. 2004, Mandriota SJ et al. 2002]. CA 9 n'est pas exprimé dans le tissu rénal normal, mais elle est généralement surexprimée dans le RCC et en particulier dans le CRCC [McKiernan JM et al. 1997, Murakami Y et al. 1999].

Pour cette étude, nous avons choisi la PCR quantitative qui pourrait mesurer la quantité de CA9 ARNm avec plus de précision. Le but de notre étude était d'évaluer si CA9 ARNm dans le sérum pourrait discriminer les CRCCs des sujets sains.

4.2 Matériels et méthodes

Les 84 patients inclus dans l'étude ont été recrutés dans le Service d'Urologie du CHU de Saint-Etienne. Les 44 témoins sains ont été recrutés à l'Etablissement Français du Sang. Tous les patients présentant un CRCC ont bénéficié d'un examen anatomopathologique permettant d'établir les stades selon le système UICC et les grades cellulaires selon Fuhrman. Les sujets sains ont été utilisés comme contrôles. Il n'y avait pas de différence statistique d'âge entre les patients malades et les contrôles ($P < 0.005$).

5 millilitres de sang ont été recueillis dans un Serum Separator Tube[®] (BD, plymouth, UK) et le sérum a été séparé dans les 2 heures. Les sérums ont été séparés par centrifugation à 1200 g pendant 10 minutes en 4°C. Les sérums ont été congelés immédiatement à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

Avant l'extraction de l'ARN, le sérum a été centrifugé à 1200 g pendant 10 minutes à 4°C. Nous avons utilisé le Rneasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour extraire l'ARN total dans le sérum. Le protocole est le suivant : 700 μ l de tampon ALT ont été ajoutés à 700 μ l de sérum et vortexé pour obtenir une distribution homogène.

700 µl d'éthanol à 70% ont été rajoutés au mélange et homogénéisés avec une pipette. 700 µl du mélange ont été déposés sur une colonne et centrifugés 30 secondes à 10000 g à 4°C. La colonne est lavée avec 700 µl de tampon RW1 et 500 µl de tampon RPE par centrifugation pendant 60 secondes à 10000 g à 4°C. L'ARN est élué 4 fois dans 30 µl d'eau stérile. L'ARN a été quantifié par spectrophotométrie à UV à 260 nm et congelé immédiatement en – 80°C.

Nous avons utilisé le SuperScript™ One-Step RT-PCR avec Platinum® Taq kit (Invitrogen, California, USA) et le thermocycler MASTER CYCLER gradient. Le volume total à tester est de 50 µl. Le mélange comprend 25 µl de la solution de 2X Reaction Mix, 1 µl de RT/Platinum® Taq Mix, 1 µl de l'amorce de départ, 1µl de l'amorce reverse (100 nM de sens et antisens), et 22 µl d'ARN. Les séquences des amorces de CA9 : l'amorce de départ GGACAAAGAAGGGGATGACC et l'amorce reverse AGTTCTGGGAGCGGCGGGA. La longueur de PCR produite est 186 bp. L'étape de RT se déroule à 50°C pendant 30 minutes, puis la dénaturation à 94°C pendant 2 minutes. La PCR est réalisée comme suit : dénaturation à 94° durant 1 minute, les chaînes d'ADN sont chauffées à 57°C durant 1 minute puis incubées à 72°C durant 1 minute. Ces trois étapes sont répétées trente quatre fois. La dernière incubation se fait à 72°C durant 5 minutes.

Le volume de la préparation de PCR quantitative est de 25 µl. Les séquences des amorces de CA9 : l'amorce de départ CAGAGTCATTGGCGCTATGGA et l'amorce reverse CGAGCTGGGGGCGGATA. La longueur de PCR produite est 100 bp. Le mélange total comprend 12.5 µl de SYBR Green® PCR Master Mix (QIAGEN S.A.), 1 µl de l'amorce de départ, 1 µl de l'amorce reverse (100 ng de sens et antisens), 1 µl de produit de RT-PCR one-step et 9.5 µl d'eau stérile. Grâce à l'appareil ABI Prism 7500 System (Applied Biosystems), la dénaturation à 95°C durant 10 minutes, quarante cycles par trois étapes comme suit : 95°C durant 15 secondes, 58°C durant 15 secondes et 72°C durant 33 secondes. Pour chaque étape à 72°C, la fluorescence en SYBR® Green est observée. Le dernier cycle de dissociation se fait à 95°C durant

15 secondes, 60°C durant 60 secondes, and 95°C durant 15 secondes. Chaque produit de PCR est étudié par électrophorèse sur gel d'agarose.

4.3 Résultats préliminaires

Le niveau de l'ARNm de CA9 dans le sérum n'est pas dépendant du sexe des patients atteints de CRCC ($P = 0.507$) ni chez les témoins sains ($P = 0.540$). Chez les patients atteints de CRCC, le niveau de CA9 ARNm dans le sérum n'est pas dépendant de l'âge ($P = 0.544$) ni du grade Fuhrman ($P = 0.053$), sauf pour le stade TNM ($P = 0.030$), pour la taille de la tumeur ($P = 0.049$) et pour la présence de métastases ($P = 0.027$).

La moyenne de l'ARNm de CA9 dans le sérum chez les patients atteints de CRCC (7820 ± 443 copies/ml) est plus haute que chez les témoins sains (0 copies/ml). Une différence significative est observée entre le groupe CRCC et le groupe témoin sain ($P < 0.001$).

Tableau III. Taux de l'ARNm de CA9 dans le sérum de sujets atteints de CRCC et de sujets témoins sains.

	No. of cases	CA9 RNA (copies/ml)	P-value
Clear cell RCC patients (N=84)			
Gender			<i>0.507</i>
Male	54	7660 ± 569	
Female	30	8100 ± 713	
Age (year) (range 35 – 86, median 64)			<i>0.544</i>
≤ 50	12	6930 ± 1020	
51-69	42	8050 ± 622	
≥ 70	30	7840 ± 792	
Stage			<i>0.030</i>
T1N₀M₀	33	6280 ± 620	
T2 N₀M₀	6	9360 ± 1920	
T3 N₀M₀	38	8690 ± 645	
Metastasis			<i>0.027</i>
N₀	77	7709 ± 784	
Yes	7	9030 ± 1800	
Fuhrman Grade			<i>0.053</i>
G1	14	8530 ± 1150	
G2	36	6460 ± 608	
G3	27	8600 ± 825	
G4	7	10300 ± 1090	
Tumor size			<i>0.049</i>
≤ 4.0 cm	36	6690 ± 700	
4.1–7.9 cm	24	7110 ± 594	
≥ 8.0 cm	24	10200 ± 810	
Healthy individuals (N=44)			
Gender			
Male	36	0	
Female	8	0	
Age (year) (range 50 – 80, median 64)			

Chez 25 patients atteints de CRCC, le sérum a été prélevé avant l'opération et après l'opération (7 jours). La moyenne de l'ARNm de CA9 dans le sérum avant l'opération (6896 ± 1044 copies/ml) est plus élevée que dans le sérum après l'opération (658 ± 307 copies/ml). Entre le groupe avant l'opération et le groupe après l'opération, la différence de l'ARNm de CA9 dans le sérum est très significative (P = 0.001).

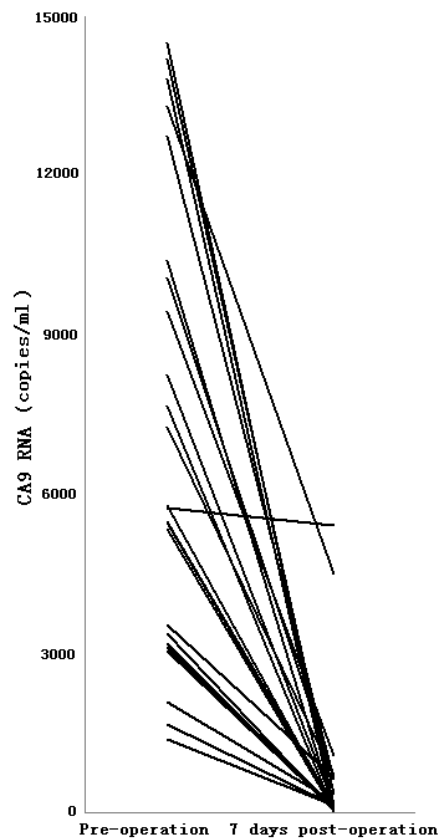


Figure 11. Taux de l'ARNm de CA9 dans le sérum avant (J0) et après (J7) exérèse d'un CRCC.

La surface sous la courbe ROC est de 0.946 (0.904 à 0.993, 95% CI), ce qui suggère une grande capacité du niveau de l'ARNm de CA9 dans le sérum pour discriminer les CRCCs des témoins sains.

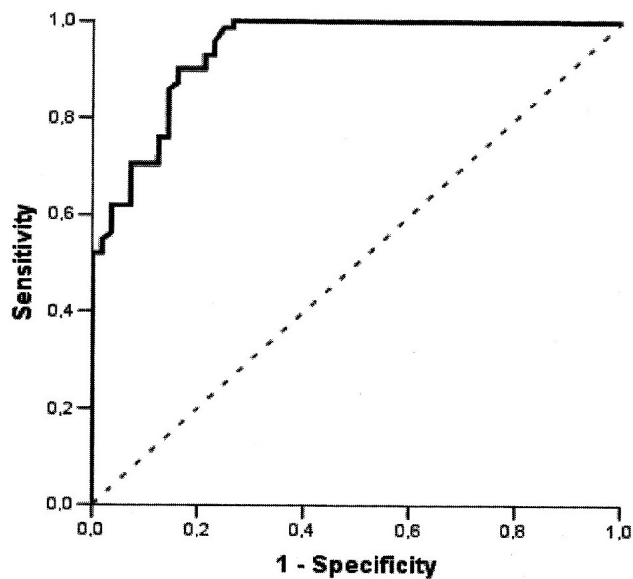


Figure 12. Courbe ROC évaluant la valeur diagnostique du taux d'ARNm de CA9 dans le sérum des les tumeurs du rein.

4.4 Discussion des résultats

Dans le sérum, un haut niveau de l'ARN total a déjà été détecté [Tsui NB et al. 2002, Feng G et al. 2008]. L'ARNm de CA9 dans le sérum, qui traduit l'activité du gène CA9 est détecté par la méthode de RT-PCR one-step, mais la PCR quantitative permet une mesure précise de l'ARNm de CA9 dans le sérum.

Les taux moyens de l'ARNm de CA9 dans le sérum des patients atteints de CRCC (7820 ± 443 copies/ml) sont plus élevés que ceux des témoins sains (0 copies/ml) ($P < 0.001$). Les niveaux de l'ARNm de CA9 dans le sérum des sujets présentant un CRCC ne varient pas en fonction du sexe ($P = 0.507$).

Les taux de l'ARNm de CA9 dans le sérum sont significativement corrélés au stade TNM et à la taille de la tumeur ($P = 0.030$, $P = 0.049$).

Le taux de l'ARNm de CA9 dans le sérum est significativement plus élevé chez les patients présentant une métastase ganglionnaire (N+) ou viscérale (M+) en comparaison des sujets présentant un CRCC localisé ($P = 0.027$). Nos observations prouvent que les patients à niveau élevé de l'ARNm de CA9 dans le sérum ont plus de risque de métastase.

La moyenne des taux de l'ARNm de CA9 dans le sérum préopératoires est significativement plus élevée que celles des taux post-opératoires ($P = 0.001$). Ces résultats indiquent que de l'ARNm de CA9 dans le sérum provient de la tumeur. L'ARNm de CA9 dans le sérum pourrait être utilisé pour la surveillance des patients après traitement chirurgical ou ablatif.

5. Article 2 en cours

Diagnostic of clear cell renal cell carcinoma by serum DNA

Gang Feng^{1,2}, Guorong Li², Anne Gentil-Perret³, Christian Genin¹, Jacques Tostain²

1. Clinical Immunology Laboratory

2. Department of Urology

3. Department of Pathology, CHU of Saint-Etienne, Faculty of Medicine Jacques Lisfranc, University JEAN-MONNET.

5.1 Introduction de l'article

L'ADN extracellulaire circulant peut-être détecté chez les témoins sains et les sujets atteints de cancer. Plusieurs équipes ont démontré des taux élevés de l'ADN circulant chez des patients atteints de cancer de l'estomac [Sai S et al. 2007], de l'ovaire [Kamat AA et al. 2006] et de la prostate [Altimari A et al. 2008]. Il n'y a pas de standard pour la quantification de l'ADN circulant. Les résultats varient avec les techniques utilisées et les procédures d'analyse. Il est donc impossible de comparer les données des différentes études.

Nous avons quantifié le niveau de l'ADN circulant dans le sérum chez des patients atteints de CCR et des sujets témoins sains par la méthode de spectrométrie et la méthode PicoGreen[®]. Nous avons tenté de déterminer si l'ADN circulant dans le sérum pourrait servir de marqueur fiable pour le diagnostic de CCR.

5.2 Matériels et méthodes

Les patients inclus dans l'étude ont été recrutés dans le Service d'Urologie du CHU de Saint-Etienne. Les témoins sains ont été recrutés à l'Etablissement Français du Sang. Tous les patients présentant un CRCC ont bénéficié d'un examen anatomopathologique permettant de déterminer le stade selon le système UICC et le grade cellulaire selon Fuhrman. Les sujets sains étaient utilisés comme contrôles. Il n'y avait pas de différence statistique d'âge entre les patients malades et les contrôles ($P < 0.005$).

5 millilitres de sang étaient recueillis dans un Serum Separator Tube® (BD, plymouth, UK) et le sérum était séparé dans les 2 heures. Les sérums étaient séparés par centrifugation à 1200 g pendant 10 minutes à 4°C puis congelés immédiatement à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

Avant l'extraction de l'ADN, le sérum était centrifugé à 1200 g pendant 10 minutes à 4°C. Nous avons utilisé le QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour extraire l'ADN total dans le sérum. Le protocole était le suivant : 40 µl de protéinase K et 400 µl du tampon AL étaient ajoutés à 400 µl de sérum, incubés à 56°C 10 minutes pour dissoudre les protéines du sérum. 400 µl d'éthanol 100% étaient ajoutés au mélange. 700µl du mélange étaient déposés sur une colonne et centrifugés 30 secondes à 10000 g à 4°C. La colonne était lavée avec 500 µl de tampon AW1 et 500 µl de tampon AW2 puis l'ADN était centrifugé pendant 30 secondes à 10000 g à 4°C. L'ADN était élué 4 fois dans 50 µl d'eau stérile puis quantifié par spectrophotométrie à UV et congelé immédiatement à -20°C.

Nous diluons du standard de l'ADN avec le tampon 1X TE pour obtenir la série des dilutions (les concentrations de 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31.2 µg/ml, 15.6 µg/ml, 7.8 µg/ml, 3.9 µg/ml et 1.9 µg/ml). 1 µl du sérum et 99 µl de 1X TE buffer étaient ajoutés dans les puits des microplaques. Une dilution de 1 :200 de réactif PicoGreen® pour 1X TE buffer était préparée. 100 µl de PicoGreen® dilués dans chaque puits de microplaque étaient ajoutés et incubés pendant 2-5 minutes à

la température ambiante et à l'abri de la lumière. La mesure était effectuée par spectrofluorométrie.

5.3 Résultats préliminaires

Chez les patients présentant un CRCC, le niveau de l'ADN circulant dans le sérum par la méthode de spectrométrie était indépendant du sexe ($P = 0.925$), de l'âge ($P = 0.613$), du stade TNM ($P = 0.789$), du grade Fuhrman ($P = 0.252$), et de la taille de la tumeur ($P = 0.073$).

La moyenne de l'ADN circulant dans le sérum chez les patients atteints de CRCC (2334.07 ± 175.1 ng/ml) était plus élevée que chez les patients atteints d'oncocytome rénal (1960.67 ± 128.2 ng/ml) et que chez les témoins sains (1697.79 ± 167.9 ng/ml). Mais une différence significative de l'ADN circulant dans le sérum n'était pas observée entre le groupe CRCC et le groupe oncocytome rénal ($P = 0.714$), entre le groupe CRCC et le groupe témoins sains ($P = 0.064$). De plus, entre le groupe oncocytome rénal et le groupe témoins sains, la différence de l'ADN circulant dans le sérum n'était pas significative ($P = 0.227$).

Tableau IV. Niveaux de l'ADN circulant dans le sérum chez des sujets atteints de CRCC, de CRTP, de CRCH, d'oncocytome rénal, de kyste du rein et chez des sujets témoins sains.

	Nb de patients	ADN sérique (ng/ml)	p-value
CRCC	62	2334.07 ± 175.1	
Age			0.613
≤ 50	9	2150.00 ± 222.7	
51-69	27	2491.67 ± 306.1	
≥ 70	26	2234.14 ± 264.4	
Sexe			0.925
Masculin	39	2221.15 ± 164.9	
Féminin	23	2525.54 ± 383.3	
Stade TNM			0.789
T1	26	2202.40 ± 205.2	
T2	2	1781.25 ± 693.8	
T3	34	2467.28 ± 276.9	
Grade de Fuhrman			0.252
1	9	2445.83 ± 545.4	
2	26	2059.62 ± 171.4	
3	22	2764.77 ± 377.1	
4	5	1665.00 ± 265.9	
Taille de la tumeur			0.073
< 4cm	27	2256.62 ± 264.7	
4-8cm	20	2080.00 ± 214.1	
> 8cm	15	2930.00 ± 486.5	
CRTP	14	2454.50 ± 248.6	
CRCH	5	2083.00 ± 322.1	
Oncocytome rénal	12	1960.67 ± 128.2	
Kyste bénin	4	1891.25 ± 160.7	
Témoins sains	17	1697.79 ± 167.9	

La surface sous la courbe ROC était de 0.647 (0.501 à 0.793, 95% CI), ce qui suggère une faible capacité du niveau de l'ADN circulant dans le sérum pour discriminer les CRCCs des témoins sains.

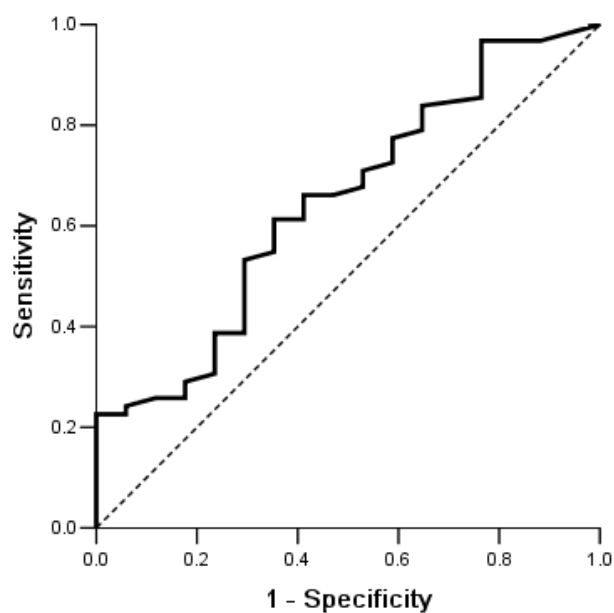


Figure 13. Courbe ROC évaluant la valeur diagnostique de l'ADN circulant dans les CRCCs.

La moyenne de l'ADN circulant dans le sérum par la méthode PicoGreen® de la totalité du groupe de patients présentant un CCR (6380.62 ± 246.6 ng/ml) était plus élevée que la moyenne observée chez les témoins sains (5778.90 ± 282.2 ng/ml), mais cette différence n'était pas significative ($P = 0.201$).

Tableau V. Taux de l'ADN circulant dans le sérum de sujets atteints de différents types de CCR et de sujets témoins sains.

	Nb	ADN sérique (ng/ml)
Ensemble des CCR	51	6380.62 ± 246.6
CRCC	35	5771.20 ± 231.9
CRTP	12	7993.20 ± 535.8
CRCH	4	6875.32 ± 816.6
Témoins sains	15	5778.90 ± 282.2

5.4 Discussion

L'ADN extracellulaire circulant peut être détecté chez les témoins sains et les sujets atteints d'affections non malignes, comme le lupus érythémateux, la polyarthrite rhumatoïde, l'embolie pulmonaire et l'infarctus du myocarde [Galeazzi M et al. 1984, Steinman CR 1984, Steinman CR 1982]. En outre, les traumatismes [Laktionov PP et al. 2004] et procédures thérapeutiques [Davis L et al. 1973, Hughes GR et al. 1971] peuvent aussi entraîner la libération d'ADN libre dans la circulation. De nombreux facteurs peuvent donc influencer le niveau de l'ADN circulant dans le sérum.

Une première étape consiste à choisir la méthode fiable et efficace pour quantifier l'ADN circulant. Plusieurs méthodes permettent de mesurer la concentration de l'ADN circulant. Nous avons utilisé la méthode de spectrométrie et la méthode PicoGreen® pour mesurer le niveau de l'ADN circulant dans le sérum chez des patients atteints de CCR et des sujets témoins sains.

La moyenne de l'ADN circulant dans le sérum chez les témoins sains était de 1698 ng/ml par spectrométrie et 5779 ng/ml par PicoGreen®. Nos résultats ne sont pas compatibles avec ceux de Sozzi G et al (3100 ng/ml). De plus, la moyenne de l'ADN circulant dans le sérum chez les patients atteints de CRCC (2334 ng/ml par spectrométrie et 6381 ng/ml par PicoGreen®) est plus basse que celle observée chez les patients atteints de cancer du poumon (24300 ng/ml) [Sozzi G et al. 2003]. Sozzi G et al ont trouvé une différence significative de l'ADN plasmatique entre le groupe cancer du poumon et le groupe témoins sains ($P = 0.0001$). Mais nous n'avons observé aucune différence significative de l'ADN circulant dans le sérum entre le groupe CCR et le groupe témoins sains. Les résultats étaient similaires par les méthodes différentes ($P = 0.064$ par spectrométrie et $P = 0.201$ par PicoGreen®). Szpehcinski A et al ont utilisé respectivement la méthode SYBR Green et la méthode de TaqMan sonde à amplifier le gène de l'actine-béata pour quantifier l'ADN plasmatique chez les patients atteints de cancer du poumon. Les concentrations de

l'ADN plasmatique m de 800 à 57000 ng/ml par la méthode SYBR Green et de 700 à 110000 ng/ml par la méthode de TaqMan sonde [Szpechcinski A et al. 2008].

La méthode de spectrométrie et la méthode PicoGreen® sont basées sur d'absorption UV. Plusieurs facteurs peut-être déranger l'absorption pendant la quantification de l'ADN circulant dans le sérum. En outre, notre échantillonnage est faible. Nos résultats ne permettent pas de considérer le taux d'ADN circulant dans le sérum comme un moyen de diagnostic du CCR. La quantification de l'ADN circulant dans le sérum par une autre méthode (par exemple, real-time PCR) est nécessaire pour confirmer nos résultats.

III- Discussion générale

Les tests diagnostiques basés sur l'analyse du sang sont attrayants en raison de la simplicité de la collecte d'échantillons. Différentes méthodes telles que l'analyse de microsatellites, l'analyse d'enrichissement par enzyme de restriction et l'analyse du polymorphisme de nucléotide unique identifient des altérations de l'ARN ou de l'ADN circulant dans le sérum et/ou dans le plasma de patients atteints de cancer qui correspondent à des altérations génétiques présentes dans les tumeurs primaires. Ces analyses du sérum et/ou du plasma peuvent être utilisées pour le diagnostic précoce et d'autres stratégies de détection. Cependant, la complexité technique et le coût élevé limitent les applications cliniques immédiates.

L'ARN, l'ADN et la protéine circulants sont utilisés pour le diagnostic ou le pronostic de différents cancers, par exemple, le cancer du sein, le cancer du poumon et le cancer de la prostate. Nous avons choisi ces marqueurs pour le diagnostic ou le pronostic du cancer rénal. La méthode de spectrométrie, de PicoGreen, de PCR, et d'ELISA sont utilisés amplement en clinique. Nous avons utilisé ces méthodes pour le diagnostic ou le suivi des patients atteints de cancer rénal.

Pour diminuer les désagréments d'acide nucléique, le sang périphérique est traité à 4 °C pendant 3-5 heures. Les produits d'extraction de l'ARN sont congelés à - 80°C et les produits de l'extraction de l'ADN sont congelés à - 20°C.

Le niveau de l'ARN circulant dans le sérum chez les patients atteints de CRCC est plus élevé que chez les témoins sains. Chez les patients atteints de CRCC, le niveau de l'ARN circulant est indépendant de l'âge, du sexe, du stade TNM, du grade Fuhrman et de la taille de la tumeur. On peut aussi détecter le haut niveau d'ARN circulant dans le sérum chez les patients CRCC de bas stade, de bas grade et dans les petites tumeurs. Nous avons mesuré les niveaux de l'ARN circulant pré-néphrectomie et post-néphrectomie (7 jours) de sujets traités pour CRCC. Après néphrectomie (7 jours), une baisse de l'ARN circulant indique que la plupart de l'ARN circulant dans le sérum vient de la tumeur. Pour le diagnostic de CRCC, la sensibilité et la spécificité de l'ARN circulant dans le sérum sont significatives. Donc, l'ARN circulant dans le sérum peut être utilisé comme biomarqueur diagnostique du CRCC.

De plus, le niveau de l'ARN circulant est mesuré par spectrométrie, méthode simple, rapide et économique.

Nous avons détecté le haut niveau de l'ARNm de CA9 dans le sérum chez les patients atteints de CRCC. Par contre, nous n'avons pas trouvé d'ARNm de CA9 dans le sérum chez les témoins sains. De plus, le niveau de l'ARNm de CA9 dans le sérum est diminué après l'opération (7 jours). Donc, nous avons indiqué que tout l'ARNm de CA9 dans le sérum vient de la tumeur rénale chez les patients atteints de CRCC. De plus, le niveau de l'ARNm de CA9 dans le sérum est indépendant de l'âge, du sexe et du grade Fuhrman, mais est corrélé au stade TNM, à la présence de métastases et à la taille de la tumeur. Le niveau de l'ARNm de CA9 dans le sérum peut donc refléter la progression de la tumeur rénale. Pour le diagnostic de CRCC, la sensibilité et la spécificité de l'ARNm de CA9 dans le sérum sont significatifs. Donc, l'ARNm de CA9 dans le sérum peut être utilisé comme biomarqueur diagnostique du CRCC. La méthode de RT-PCR quantitative est complexe et coûteuse, mais elle peut quantifier précisément le niveau de l'ARNm de CA9.

Dans nos études, nous avons utilisé 2 méthodes différentes pour mesurer le niveau de l'ADN circulant dans le sérum. Le produit d'extraction de l'ADN est mesuré par spectrométrie et le niveau de l'ADN circulant dans le sérum est mesuré directement par la méthode de PicoGreen®. Par spectrométrie, la moyenne de l'ADN circulant dans le sérum chez les patients atteints de CRCC est plus élevée que chez les témoins sains, mais cette différence n'est pas significative. De même, par la méthode PicoGreen®, la moyenne de l'ADN circulant dans le sérum chez les patients atteints de CRCC est similaire à celle des témoins sains et la différence n'est pas significative. Des niveaux élevés d'ADN circulant sont observés chez les patients atteints des cancers testiculaire, colorectal et ovarien [Ellinger J et al. 2009, Schwarzenbach H et al. 2008, Zachariah RR et al. 2008]. Nos résultats par la méthode de spectrométrie et par la méthode de PicoGreen® indiquent que la différence n'est pas significative entre les patients atteints de CRCC et les témoins sains. Pour le diagnostic de CRCC, la sensibilité et la spécificité de l'ADN circulant dans le sérum ne sont pas significatives. Il y a des explications possibles pour nos résultats sur l'ADN circulant : l'ADN tumoral ne

représente pas tout l'ADN circulant dans le sérum chez les patients atteints de CRCC. Le nombre de nos échantillons n'est pas suffisant pour une étude statistique. Les méthodes utilisées sont insuffisantes pour mesurer l'ADN circulant. Donc, plus d'échantillons et une autre méthode (par exemple, la PCR en temps réel) sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

Dans la littérature, la méthode PCR en temps réel a été utilisée pour mesurer l'intégrité de l'ADN circulant. Dans nos études, nous avons choisi la PCR traditionnelle pour détecter les fragments de tailles différentes du gène GAPDH de l'ADN sérique. La distribution du gène GAPDH est homogène dans l'organisme et ce gène est utilisé normalement comme gène contrôle dans beaucoup d'essais. En outre, le niveau de l'ADN circulant du gène GAPDH ne permet pas de détecter de différence significative entre les groupes en fonction du sexe et de l'âge [Zhong XY et al. 2007]. Nous avons détecté 4 fragments de tailles différentes (109 bp, 193 bp, 397 bp et 456 bp) du gène GAPDH. Le fragment de 109 bp est utilisé comme contrôle de la qualité de l'ADN circulant dans le sérum et détecté dans tous les spécimens. Chez les témoins sains, nous avons détecté seulement les fragments de 109 bp et 193 bp. Notre résultat est comparable à l'étude de Giacona MB et al sur la longueur de l'ADN du plasma chez les témoins sains [Giacona MB et al. 1998]. Par contre, les fragments de 397 bp et 456 bp sont détectés chez les patients atteints de CRCC. Nos résultats indiquent que l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum chez les patients atteints de CRCC est mieux conservée que chez les témoins sains. De plus, nous avons aussi comparé l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum de pré-néphrectomie et post-néphrectomie (7 jours). L'intégrité de l'ADN circulant est diminuée significativement après néphrectomie. Nos résultats indiquent que tous les fragments longs viennent de la tumeur rénale. De plus, chez les patients atteints de CRCC, il n'a pas été observé de différence significative entre les groupes pour l'âge, le sexe et le grade de Fuhrman. En outre, l'intégrité de l'ADN circulant est meilleure chez les patients présentant un stade élevé (T3) et/ou une grosse tumeur (> 4.0cm). Ces résultats peuvent être expliqués par la nécrose dépendant du stade et de la dimension de la tumeur. En conséquence, l'ADN circulant chez les patients atteints de CRCC a une

large gamme de longueurs de fragments d'ADN génomique après digestion incomplète ou aléatoire. Pour le diagnostic de CRCC, la sensibilité et la spécificité de l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum sont significatives. Donc, l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum peut être utilisée comme biomarqueur diagnostique du CRCC. La méthode de PCR traditionnelle est simple et économique. Mais, cette méthode quantifie qu'approximativement l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum.

Nous avons utilisé la méthode ELISA pour quantifier directement le niveau de la protéine CA9 dans le sérum. La moyenne de la protéine CA9 dans le sérum chez les patients atteints de CRCC est plus élevée que chez les témoins sains. Il n'a pas été observé de différence significative entre les groupes pour l'âge et le sexe. En outre, la moyenne de la protéine CA9 dans le sérum est plus élevée chez les patients présentant un stade élevé (T3), un grade élevé (3+4), et une grosse tumeur (> 4.0cm). De plus, le niveau de la protéine CA9 dans le sérum est corrélé à la présence de métastases et de récurrence. Le niveau de la protéine CA9 dans le sérum peut donc refléter la progression de la tumeur rénale. Pour le diagnostic de CRCC, la sensibilité et la spécificité de la protéine CA9 dans le sérum sont significatives. Donc, la protéine CA9 dans le sérum peut être utilisée comme biomarqueur diagnostique du CRCC.

Selon nos résultats, l'ARN circulant, l'ARNm de CA9, l'intégrité de l'ADN circulant et la protéine CA9 peuvent être utilisés comme biomarqueurs diagnostiques du CRCC. Les sensibilités et les spécificités des biomarqueurs sont significatives. La méthode de spectrométrie et de PCR traditionnelle sont simples et économiques pour mesurer l'ARN circulant et l'intégrité de l'ADN circulant. On pourrait utiliser l'ARN circulant et l'intégrité de l'ADN circulant pour chercher un CRCC dans un groupe présentant des hauts risques de cancer rénal. La méthode de RT-PCR quantitative est complexe et coûteuse pour mesurer l'ARNm de CA9, mais, l'ARNm de CA9 a une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité que les autres marqueurs. On pourrait utiliser l'ARNm de CA9 pour suspecter un CRCC.

Traditionnellement, 85% à 90% des masses solides rénales sont considérées comme des CCR. En utilisant la tomodensitométrie abdominale ou d'autres techniques

d'imagerie, beaucoup de petites tumeurs rénales asymptomatiques sont découvertes fortuitement [Vasudevan A et al. 2006]. Or, 20% des petites tumeurs rénales solides seraient bénignes [Li G et al. 2004], et l'imagerie distingue difficilement une petite lésion bénigne d'une petite lésion maligne [Zhang J et al. 2007]. Un diagnostic préopératoire de bénignité ou de malignité est pourtant essentiel à l'heure où la chirurgie partielle tend à supplanter la néphrectomie totale pour ces petites tumeurs, et où apparaissent d'autres modes de prise en charge : thérapeutiques destructrices par radiofréquence ou cryoablation.

L'aspiration à l'aiguille fine (FNA) est une technique sûre, peu traumatisante, et les complications sont rares. Toutefois, le nombre de cellules obtenues par la FNA est très faible (seulement quelques cellules), et les cellules anormales peuvent être absentes, rendant le diagnostic cytologique impossible ou faussement négatif. Les progrès récents des techniques cytologiques, en particulier avec l'aide des biomarqueurs moléculaires, améliorent la sensibilité et la spécificité de la FNA [Li G et al. 2006]. Comme l'imagerie guidée pour la biopsie percutanée, la FNA des masses rénales peut être utilisée pour diagnostiquer les tumeurs bénignes et ainsi adapter la prise en charge [Jaff A et al. 2005, Wunderlich H et al. 2005]. Toutefois, la FNA est une procédure coûteuse et complexe, qui nécessite un radiologue et un cytopathologiste expérimentés.

Nous avons analysé les résultats des petites tumeurs solides (diamètre ≤ 4 cm). Les sensibilités et les spécificités de l'ARN circulant (79% et 53%), de l'intégrité de l'ADN circulant (81% et 61%), l'ARNm de CA9 (83% et 100%) sont significatives. L'ARNm de CA9 a une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité. L'ARN circulant et l'intégrité de l'ADN circulant sont des méthodes simples et économiques pour aider à identifier une tumeur maligne avant l'opération. Selon nos résultats, on pourrait utiliser ces marqueurs pour aider à distinguer les petites tumeurs rénales solides avant l'opération.

D'après la méthode statistique du t-test et l'analyse de régression, nous avons comparé les résultats de l'ARN circulant, de l'ARNm de CA9, de l'ADN circulant et de

la protéine CA9 dans le sérum chez les mêmes patients (32 patients). Les niveaux de l'ARN circulant et de l'ADN circulant sont significativement différents ($P=0.006$) et significativement indépendants ($R=0.273$). Les niveaux de l'ARN circulant et de protéine CA9 sont significativement différents ($P=0.015$) et significativement indépendants ($R=0.328$). De plus, les niveaux de l'ADN circulant et de la protéine CA9 sont aussi significativement différents ($P=0.011$) et significativement indépendants ($R=0.364$). Les explications des résultats sont inconnues. Nous supposons que les mécanismes de sortie et de dégradation de l'ARN circulant, de l'ADN circulant et de la protéine CA9 peuvent être différents dans la circulation. Par contre, les niveaux de l'ARN circulant et de l'ARNm de CA9 sont significativement identiques ($P=0.374$) et significativement corrélés ($R=0.847$). Nous supposons que les mécanismes de sortie de l'ARN circulant et de l'ARNm de CA9 peuvent être similaires. La fabrication des protéines dépend toujours des ARNm. Dans les cellules, le niveau de la protéine est aussi corrélé au niveau de l'ARNm. Nous n'avons pas trouvé de relation entre le niveau de la protéine CA9 et le niveau de l'ARNm de CA9 dans le sérum ($R=0.558$). Nous ne savons pas la raison exacte.

Une difficulté de suivi après l'ablation du CCR est la prédiction précoce de la récurrence. Environ 70% des CCR sont des tumeurs localisées. Mais, 30-40% des patients présenteront une évolution métastatique mortelle. La plupart des récurrences apparaissent dans les trois à cinq ans après la chirurgie [Skolarikos A et al. 2007]. Donc, l'évaluation des risques de récurrence est importante.

Le niveau de l'ARN circulant, de l'ARNm de CA9 et de l'intégrité de l'ADN circulant est diminué après l'opération. Donc, on pourrait utiliser ces marqueurs pour surveiller les patients atteints de CRCC après l'opération. Mais, l'ARN circulant et l'intégrité de l'ADN circulant ne sont pas des marqueurs spécifiques du cancer rénal. En dehors de la récurrence du cancer rénal, plusieurs facteurs peuvent augmenter l'ARN circulant et l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum. De plus, le niveau de l'ARN circulant dépend de la standardisation du recueil et du traitement des échantillons en clinique. L'ARNm de CA9 et la protéine CA9 sont des marqueurs spécifiques du cancer rénal,

mais, le niveau de l'ARNm de CA9 dépend de la standardisation du recueil et du traitement des échantillons en clinique. La qualité de l'échantillon influe beaucoup sur le niveau de l'ARNm de CA9 dans le sérum. Par contre, la protéine CA9 est plus stable que l'ARNm de CA9 dans le sérum. Donc, nous avons choisi la protéine CA9 et étudié la protéine CA9 comme le marqueur pronostique du cancer rénal.

La moyenne de la protéine CA9 dans le sérum chez les patients atteints de CRCC métastatique ou récurrence de CRCC est plus élevée que celle des patients atteints de CRCC localisés. Dans notre étude sur le taux préopératoire de la protéine CA9 dans le sérum chez des sujets présentant un CRCC localisé, la courbe de survie de Kaplan-Meier indique que le groupe à taux élevé de protéine CA9 a un plus grand risque de récurrence que le groupe avec taux faible. Dans l'analyse univariée de régression de Cox, le niveau de la protéine CA9 sérique est un facteur plus sensible que le stade TNM, la taille de la tumeur et le grade Fuhrman. Donc, le niveau de la protéine CA9 dans le sérum pourrait être utilisé pour guider le suivi post opératoire et peut être dans l'avenir indiquer un traitement adjuvant précoce des patients du groupe à haut risque de récurrence.

Les études approfondies sont nécessaires pour connaître les mécanismes de sortie et de dégradation des marqueurs. Les études au long cours sont nécessaires pour apprécier l'utilisation multiple de marqueurs.

IV - Conclusion générale

Notre étude est la première à s'intéresser de manière systématique aux biomarqueurs sériques des patients atteints de CCR.

Nous avons montré que le taux de l'ARN circulant dans le sérum chez les patients atteints de CRCC était plus élevé que chez les patients atteints d'oncocytome rénal et que chez les témoins sains. Le taux élevé de l'ARN circulant dans le sérum pourrait constituer un marqueur pour le diagnostic de CRCC.

Nous avons montré que le taux de l'ARN messenger de CA9 dans le sérum chez les patients atteints de CRCC était plus élevé que chez les témoins sains. Le taux élevé de l'ARN messenger de CA9 dans le sérum pourrait représenter un marqueur puissant pour le diagnostic de CRCC.

Nous avons montré que l'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum chez les patients atteints de CRCC était meilleure que chez les patients atteints d'oncocytome rénal et que chez les témoins sains. L'intégrité de l'ADN circulant dans le sérum pourrait constituer un marqueur pour le diagnostic de CRCC.

Nous avons montré que le niveau de protéine CA9 dans le sérum chez les patients atteints de CRCC métastatique était plus élevé que chez les patients atteints de CRCC localisé et que chez les témoins sains. Le niveau élevé de protéine CA9 dans le sérum suggère un risque élevé de récurrence. Le niveau de protéine CA9 dans le sérum pourrait aider au suivi post-opératoire des patients atteints de CRCC.

Le CA9, surtout sous forme d'ARN messenger présent dans le sérum, semble prometteur pour le diagnostic précoce et le suivi des malades porteurs de CRCC par une technique de biologie moléculaire très standardisable et reproductible. Un brevet a été déposé pour envisager une exploitation industrielle.

V- BIBLIOGRAPHIE

Altimari A, Grigioni AD, Benedettini E, Gabusi E, Schiavina R, Martinelli A, Morselli-Labate AM, Martorana G, Grigioni WF, Fiorentino M. Diagnostic role of circulating free plasma DNA detection in patients with localized prostate cancer. *Am J Clin Pathol.* 2008; 129: 756-762.

Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes a shown in an in vitro system. *Cancer Res* 1975; 35: 2375-2382.

Ayala W, Moore LV, Hess EL. The purple color reaction given by diphenylamine reagent I with normal and rheumatic sera. *J Clin Invest* 1951; 30: 781-785.

Badger MR, Price GD. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio* 1994; 45: 369-392.

Bassil B, Dosoretz DE, Prout GR Jr. Validation of the tumor, nodes and metastasis classification of renal cell carcinoma. *J Urol.* 1985; 134: 450-454.

Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, Ducrocq X, Massard G, Gasser B, Chenard MP, Kessler R, Anker P, Stroun M, Weitzenblum E, Pauli G, Wihlm JM, Quoix E, Oudet P. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer Patients. *Int J Cancer* 2003; 105: 361-370.

Blinov M, Luganova I, Vladimirova A. Factors of nucleic nature in human blood plasma. *Vopr Med Khim* 1981; 27: 600-603.

Boddy JL, Gal S, Malone PR, Harris AL, Wainscoat JS. Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1394-1399.

Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rödl H, Eichinger M, Feurer M, Weidt E, Puranakanittha C, Neuhaus C, Pomer S, Brenner W, Schirmacher P, Störkel S, Rotter M, Masera A, Gugeler N, Decker HJ. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res* 2000; 60: 1942-1948.

Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P, Stroun M, Anker P. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3823-3826.

Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Lyautey J, Lederrey C, Faltin-Traub E, Stroun M, Anker P. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2297-2303.

Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353 :2477-2790.

Coulange C, Davin JL. Urologie et cancer. Paris; John Libbey Eurotext: 2004.

Dasi F, Lledo S, Garcia-Granero E, Ripoll R, Marugan M, Tormo M. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest* 2001; 81: 767-769.

Davis L, Davis JS. Detection of circulating DNA by counter immune electrophoresis (CIE). *Arthritis Rheum* 1973; 16: 52-58.

De Riese WT, Crabtree WN, Allhoff EP, Werner M, Liedke S, Lenis G, Atzpodien J, Kirchner H. Prognostic significance of Ki-67 immunostaining in nonmetastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 1993; 11: 1804-1808.

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press; 2004.

Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, Perabo FG, Mueller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J Urol* 2009; 181: 363-371.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*, 2007;18: 581-592.

Foss AJ, Guille MJ, Occleston NL, Hykin PG, Hungerford JL, Lightman S. The detection of melanoma cells in peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995; 72: 155-159.

Fournie GJ, Courtin JP, Laval F. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death: investigation in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumour. *Cancer Lett* 1995; 2: 221-227.

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma *Am J Surg Pathol.* 1982; 6: 655-663.

Fujiwara Y, Chi DD, Wang H, Keleman P, Morton DL, Turner R, Hoon DS. Plasma DNA microsatellites as tumor-specific markers and indicators of tumor progression in melanoma patients. *Cancer Res* 1999; 59: 1567-1571.

Galeazzi M, Morozzi G, Piccini M, Chen J, Bellisai F, Fineschi S, Marcolongo R. Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 50-55.

Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: Length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 1998; 17: 89-97.

Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994; 7: 85-90.

Grabmaier K, A de Weijert MC, Verhaegh GW, Schalken JA, Oosterwijk E. Strict regulation of CAIX (G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* 2004; 23: 5624-5631.

Gross HJ, Verwer B, Houck D, Hoffman RA, Recktenwald D. Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as 10^{-7} . *Proc Natl Acad Sci US A* 1995; 92: 537-541.

Hanley R, Rieger-Christ KM, Canes D, Emara NR, Shuber AP, Boynton KA, Libertino JA, Summerhayes IC. DNA integrity assay: a plasma-based screening tool for the detection of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12: 4569-4574.

Hasselmann DO, Rappl G, Rössler M, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. Detection of tumor-associated circulating mRNA in serum, plasma and blood cells from patients with disseminated malignant melanoma. *Oncol Rep* 2001; 8: 115-118.

Hughes GR, Cohen SA, Lightfoot RW Jr, Meltzer JI, Christian CL. The release of DNA into serum and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1971;14: 259-266.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF a targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation : Implications for O₂ sensing. *Science* 2001; 292 : 464-468.

Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001; 158: 905-919.

Jaff A, Molinié V, Mellot F, Guth A, Lebret T, Scherrer A. Evaluation of imaging-guided fine-needle percutaneous biopsy of renal masses. *Eur Radiol* 2005; 15: 1721-1726.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659-1665.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30.

Jin Z, El-Deiry WS Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 139-163.

Kamat AA, Sood AK, Dang D, Gershenson DM, Simpson JL, Bischoff FZ. Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1075: 230-234.

Kamm RC, Smith AG. Ribonuclease activity in human plasma. *Clin Biochem* 1972; 5: 198-200.

Kamm RC, Smith AG. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem* 1972; 18: 519-522.

Katagiri A, Watanabe R, Tomita Y. E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. *Br J Cancer.* 1995; 71 :376-379.

Kaznatcheev V, Polyakov Y. A study of some indices of nucleic acid metabolism in patients with atherosclerosis. *Kardiologiya* 1967; 7: 22-25.

Kondo K, Yao M, Yoshida M, Kishida T, Shuin T, Miura T, Moriyama M, Kobayashi K, Sakai N, Kaneko S, Kawakami S, Baba M, Nakaigawa N, Nagashima Y, Nakatani Y, Hosaka M. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinico-pathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34: 58-68.

Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. Clin Cancer Res 1999; 5: 1961-1965.

Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Sumarokov SV, Kolomiets SA, Sevostianova NV, Vlassov VV. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2004; 23: 879-883.

Lam NY, Rainer TH, Chan LY, Joynt GM, Lo YM. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. Clin Chem 2003; 49: 1286-1291.

Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Science 1993; 260: 1317-1320.

Lee JB. Compounds interfering in the diphenylamine test for deoxyribonucleic acid. Nature 1963; 20: 264-266.

Leon SA, Green A, Yaros MJ, Shapiro B. Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. J Immunol Methods 1975; 9: 157-164.

Leslie H. Sobin and Ch. Wittekind International Union Against Cancer, UICC, in TNM Classification of Malignant Tumors, 6th edition. New York, Wiley-Liss, 2002.

Li CN, Hsu HL, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA is released from tumor cells upon cell death: a study of tissue cultures of tumor cell lines. J Clin Lab Anal 2003; 17: 103-107.

Li G, Cuilleron M, Gentil-Perret A, Cottier M, Passebosc-Faure K, Lambert C, Genin C, Tostain J. Rapid and sensitive detection of messenger RNA expression for molecular differential diagnosis of renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2003; 9: 6441-6446.

Li G, Cuilleron M, Cottier M, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C, Tostain J. The use of MN/CA9 gene expression in identifying malignant solid renal tumors. *Eur Urol.* 2006; 49: 401-405.

Li G, Cuilleron M, Gentil-Perret A, Tostain J. Characteristics of image-detected solid renal cell carcinoma: implication for optimal treatment. *Int J Urol* 2004; 11: 63-67.

Li G, Feng G, Gentil-Perret A, Genin C, Tostain J. CA9 gene expression in conventional renal cell carcinoma: a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *Clin Exp Metastasis.* 2007; 24: 149-155.

Li G, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C, Tostain J. S100A1 and KIT gene expressions in common subtypes of renal tumours. *Eur J Surg Oncol.* 2005; 31: 299-303.

Li G, Passebosc-Faure K, Lambert C, Gentil-Perret A, Blanc F, Oosterwijk E, Mosnier JF, Genin C, Tostain J. The expression of G250/mn/CA9 antigen by flow cytometry: its possible implication for detection of micrometastatic renal cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 89-92.

McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, Stifelman MD, Katz AE, Chen MW, Olsson CA, Sawczuk IS. Expression of the tumor-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 2362-2365.

Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 1948; 142: 241-243.

Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, Murray PG, Morgan NV, Sowter HM, Wykoff CC, Maher ER, Harris AL, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* 2002; 1: 459-468.

Margulis V, Tamboli P, Matin SF, Meisner M, Swanson DA, Wood CG.. Redefining pT3 renal cell carcinoma in the modern era: a proposal for a revision of the current TNM primary tumor classification system. *Cancer*. 2007; 109: 2439-2444.

Mattano LA Jr, Moss TJ, Emerson SG. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1992; 52: 4701-4705.

Meldrum NU, Roughton FJ. The state of carbon dioxide in blood *J. Physiol* 1933; 80: 143-170.

Moch H, Schraml p, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Olli P, Sauter G. High-Throughput Tissue Microarray Analysis to Evaluate Genes Uncovered by cDNA Microarray Screening in Renal Cell Carcinoma. *Am J Pathol* 1999; 154: 981-986.

Moss TJ, Sanders DG. Detection of neuroblastoma cells in blood. *J Clin Oncol* 1990; 8: 736-740.

Murakami Y, Kanda K, Tsuji M, Kanayama H, Kagawa S. MN/CA9 gene expression as a potential biomarker in renal cell carcinoma. *BJU Int* 1999; 83: 743-747.

Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, Lo ES, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YM. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002; 48: 1212-1217.

Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin WG Jr, Iliopoulos O. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell* 1998; 1: 959-968.

Pan CC, Chen PC, Chiang H. Overexpression of KIT (CD117) in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Am J Clin Pathol*. 2004; 121: 878-883.

Pantuck AJ, Zeng G, Belldegrun AS, Figlin RA. Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4641-52.

Paradis V, Ferlicot S, Ghannam E, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwége P, Jardin A, Benoît G, Bedossa P. CD44 is an independent prognostic factor in conventional renal cell carcinomas. *J Urol*. 1999; 161: 1984-1987.

Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, Mohan A, Guleria R. Circulating Cell-Free DNA in Plasma/Serum of Lung Cancer Patients as a Potential Screening and Prognostic Tool. *Clin Chem* 2006; 52: 1833-1842.

Roszkowski K, Chorostowska-Wynimko J. Evaluation of fluorescence-based methods for total vs. amplifiable DNA quantification in plasma of lung cancer patients. *J Physiol Pharmacol*. 2008; 59: 675-681.

Sai S, Ichikawa D, Tomita H, Ikoma D, Tani N, Ikoma H, Kikuchi S, Fujiwara H, Ueda Y, Otsuji E. Quantification of plasma cell-free DNA in patients with gastric cancer. *Anticancer Res*. 2007; 27: 2747-2751.

Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004 ; 5 : 343-354.

Schwarzenbach H, Stoecklacher J, Pantel K, Goekkurt E. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1137: 190-196.

Semenza GL cHypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35: 71-103.

Sisco KL. Is RNA in serum bound to nucleoprotein complexes? Clin Chem 2001; 47: 1744–1745.

Siow WY, Yip SK, Ng LG, Tan PH, Cheng WS, Foo KT. Renal cell carcinoma: incidental detection and pathological staging. J R Coll Surg Edinb 2000; 45: 291-295.

Skates S, Iliopoulos O. Molecular markers for early detection of renal carcinoma: investigative approach. Clin Cancer Res. 2004; 10: 6296-6301.

Skolarikos A, Alivizatos G, Laguna P, de la Rosette J. A review on follow-up strategies for renal cell carcinoma after nephrectomy. Eur Urol 2007; 51: 1490-1497.

Smith KS, Jakubzick C, Whittam TS, Ferry JG. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96: 15184-15189.

Sorenson GD, Porter DM, Barth RJ. Detection of mutated KRAS2 sequences in plasma from patients with pancreatic carcinoma in comparison with the CA19-9 assay. J Int Soc Oncodev Biol Med 1977; 18: 66-69.

Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. J Clin Oncol. 2003; 21: 3902-3908.

Steinman CR. Use of nucleic acid hybridization for specific detection of submicrogram quantities of DNA, and its application to human plasma. Clin Chem 1975; 21: 407-411.

Steinman CR. Circulating DNA in polyarteritis nodosa and related syndromes. Arthritis Rheum 1982; 25: 1425-1430.

Steinman CR. Circulating DNA in systemic lupus erythematosus: isolation and characterization. J Clin Invest 1984; 73: 832-841.

Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer 1997; 80:987-989.

Stroun M, Anker P, Maurice P, Gahan PB. Circulating nucleic acids in higher organisms. Int Rev Cytol 1977; 51: 1-48.

Su KY, Pisetsky DS. The role of extracellular DNA in autoimmunity in SLE. Scand J Immunol. 2009; 70: 175-183.

Szpechcinski A, Struniawska R, Zaleska J, Chabowski M, Orlowski T,

Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kühn R, Wittekind CW. Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. Cancer. 1996; 77 :164-171.

Tsui NB, Ng EK, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. Clin Chem 2002; 48: 1647-1653.

Vasudevan A, Davies RJ, Shannon BA, Cohen RJ. Incidental renal tumours: the frequency of benign lesions and the role of preoperative core biopsy. BJU Int. 2006; 97: 946-949.

Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. Semin Oncol 2001; 28: 29-35.

Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, Roden R, Sokoll LJ, Chan DW, Shih IM. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. Cancer Res 2003; 63: 3966-3968.

Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. J Biol Chem 1993; 268 : 21513-21518.

Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, Jürgensen JS, Gruber G, Maxwell PH, Löning SA, Frei U, Maher ER, Gröne HJ, Eckardt KU. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res* 2001; 61:5215-5222.

Wunderlich H, Hindermann W, Al Mustafa AM, Reichelt O, Junker K, Schubert J. The accuracy of 250 fine needle biopsies of renal tumors. *J Urol* 2005; 174: 44-46.

Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60: 7075-7083.

Wykoff CC, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene*. 2000 14; 19: 6297-6305.

Wyllie AH Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.

Xie GS, Hou AR, Li LY, Gao YN, Cheng SJ. Quantification of plasma DNA as a screening tool for lung cancer. *Chin Med J* 2004; 117: 1485-1488.

Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N, Baba M, Kobayashi K, Miura T, Moriyama M, Nagashima Y, Nakatani Y, Kubota Y, Kondo K. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Nat Cancer Inst*. 2002; 94: 1569-1575.

Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, Radpour R, Holzgreve W, Zhong X. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 2008; 112: 843-850.

Zhang J, Lefkowitz RA, Ishill NM, Wang L, Moskowitz CS, Russo P, Eisenberg H, Hricak H. Solid renal cortical tumors: differentiation with CT. *Radiology* 2007; 244: 494-504.

Zhong XY, Hahn S, Kiefer V, Holzgreve W. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations? *Ann Hematol* 2007; 86: 139-143.